

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR  
VINCENT ROY**

**CARACTÉRISATION DE GÈNES CODANT POUR DES PROTÉINES DE  
SURFACE DE LA BACTÉRIE *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*  
À L'AIDE D'UN PROCÉDÉ D'INVASION DE CELLULES HELA**

**OCTOBRE 2006**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## **REMERCIEMENTS**

Contrairement à la croyance populaire, les gens qui effectuent de la recherche sont rarement seuls, isolés dans le sous-sol d'un bâtiment désaffecté. Je tiens à remercier les gens avec lesquels j'ai travaillé durant la réalisation de mes travaux de maîtrise ;

Le Dr. Marc Sirois

L'équipe du laboratoire : Valérie Ouellet, Jean-François Schmout, Kim Després,  
Annet Lavallée et Karine De Carufel

Le Dr. Marc Beauregard et son équipe

Et finalement l'équipe du laboratoire du Dr. Éric Asselin

Merci à vous tous

## RÉSUMÉ

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) est responsable de la pleuropneumonie porcine, une infection respiratoire très contagieuse causant d'importantes pertes économiques dans l'industrie du porc. L'infection par App est un processus qui implique plusieurs facteurs de virulence agissant seuls ou, plus souvent, conjointement pour permettre l'établissement de la bactérie chez son hôte naturel, le porc. Plusieurs de ces facteurs de virulence sont toujours méconnus. Pratiquement tous les facteurs de virulence sont localisés sur la surface de la membrane des bactéries ou sont sécrétés dans l'environnement extracellulaire. Dans ce présent document, il est décrit l'utilisation d'une technologie originale (basée sur la complémentation de l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis*) afin de mettre en évidence des gènes qui codent pour des protéines de surface. Cette technologie est basée sur un procédé développé par Worley *et al.* permettant de sélectionner les bactéries exprimant une protéine de surface, l'invasine. 300 clones invasifs ont ainsi été sélectionnés et des analyses des séquences d'ADN d'App clonés ont ensuite été réalisées. Parmi ces clones, 41 ont été séquencés et ont été comparés avec les séquences génomiques d'App des banques de données. Après comparaison, plusieurs clones ont montré une homologie avec des lipoprotéines, des protéines de la membrane externe et des transporteurs chez App et chez d'autres espèces bactériennes. De plus, 5 clones comportent une séquence signal prédite par le logiciel SignalP. Notre approche d'isolation de peptide signal fusionné avec l'invasine pourrait aider à compléter les projets de séquençages de génomes bactériens déjà en cours. Ensuite, il sera intéressant d'éclaircir le rôle que les protéines isolées peuvent avoir chez App, et surtout de déterminer leur importance au niveau de la virulence de la bactérie. L'identification et la caractérisation subséquente des gènes permettant l'exportation de l'invasine pourraient avoir un impact important sur le développement de nouveaux vaccins protégeant contre la pleuropneumonie porcine.

Mots clés : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, facteurs de virulence, invasine, protéine de membrane externe, peptide signal.

## **IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE**

J'ai réalisé l'ensemble des travaux de laboratoire mentionnés dans ce document. J'ai également procédé à la rédaction de l'article scientifique sous la supervision de mon directeur de maîtrise, le Dr Marc Sirois.

Le Dr. Marc Sirois a été le directeur et superviseur des travaux de laboratoire et il a également participé à la rédaction de l'article scientifique dans le but de le soumettre à la revue «BMC Microbiology».

Des analyses bio-informatiques complémentaires des séquences obtenues ont été réalisées par le Dr John Nash, un collaborateur d'Ottawa.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	x
<b>CHAPITRE I INTRODUCTION <i>ACTINOBACILLUS</i></b>	
<b><i>PLEUROPNEUMONIAE</i>.....</b>	
1.1 Historique de la bactérie.....	1
1.2 Pathobiologie des infections à App.....	2
1.3 La pathogenèse des infections à App .....	3
1.3.1 Colonisation .....	3
1.3.2 Évasion des mécanismes de défense de l'hôte.....	4
1.3.3 Dommage aux tissus de l'hôte .....	5
1.4 Traitement et prévention .....	5
<b>CHAPITRE II LA VIRULENCE D'<i>ACTINOBACILLUS</i></b>	
<b><i>PLEUROPNEUMONIAE</i>.....</b>	
2.1 Exotoxines de type RTX .....	7
2.2 Lipopolysaccharides (LPS) et polysaccharides capsulaires (CPS) .....	8
2.3 Pili et Fimbriae.....	8
2.4 L'acquisition du fer à l'intérieur de l'hôte .....	9
2.5 Autres facteurs de pathogénicité .....	11
<b>CHAPITRE III LES PROTÉINES DE MEMBRANE EXTERNES, LES</b>	
<b>PEPTIDES SIGNAUX ET LEURS MÉTHODES</b>	
<b>D'IDENTIFICATION .....</b>	
3.1 Les protéines de membrane externes et le peptide signal .....	12
3.1 Les méthodes d'identification des peptides signaux.....	15
3.1.1 Méthodologie phoA .....	15

3.1.2 Méthode bio-informatique .....	17
3.2.3 Méthodologie utilisant l'invasine.....	18
3.2.4 L'invasine.....	18
<b>CHAPITRE IV LES VACCINS ET APP.....</b>	<b>22</b>
4.1 L'élaboration de nouveaux vaccins plus efficaces.....	22
4.2 Les types de vaccins disponibles présentement .....	23
<b>CHAPITRE V PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>24</b>
5.1 Problématique .....	24
5.2 Hypothèses et objectifs .....	24
5.3 Description des différents chapitres du mémoire.....	25
<b>CHAPITRE VI ARTICLE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>26</b>
6.1 Screening for surface proteins coding genes from <i>Actinobacillus</i> pleuropneumoniae using a cell-invasion selection process.....	26
6.2 Abstract .....	27
6.3 Background .....	28
6.4 Results.....	30
6.4.1 Constructions and library enrichment .....	30
6.4.2 Sequence analysis.....	30
6.5 Discussion .....	31
6.5.1 Analysis of clones .....	31
6.6 Conclusions.....	35
6.7 Methods.....	36
6.7.1 Reagents and strains.....	36
6.7.2 Culture methods .....	36
6.7.3 Construction of pTBInv .....	36
6.7.4 Construction of a recombinant library in <i>E. coli</i> .....	36
6.7.5 Library enrichments/invasion assays .....	37
6.7.6 Sequence analysis.....	38
6.8 Authors' contributions .....	38
6.9 Acknowledgements.....	38
6.10 References.....	39

6.11 Figures.....	45
6.12 Table.....	46
<b>CHAPITRE VII DISCUSSION .....</b>	<b>47</b>
7.1 Synthèse et interprétation des résultats .....	47
7.2 Limites de la technique .....	48
7.3 Importance prévue des travaux .....	48
7.4 Perspective de recherche .....	49
7.5 Alternative de détection de l'invasine par un procédé original	
immuno-magnétique .....	51
7.5.1 Clonage, expression et purification de l'invasine tronquée .....	52
7.5.2 Production d'anticorps anti-invasine chez le lapin .....	52
7.5.3 Adsorption des anticorps secondaires .....	53
7.5.4 Détection de l'expression de l'invasine par anticorps.....	53
<b>CHAPITRE VIII CONCLUSION.....</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>57</b>



## LISTE DES TABLEAUX

1.1 : Toxines sécrétées par les sérotypes d'App .....	2
6.1 : Genes identified and deduced sequence of proteins that promoted $\Delta$ Inv export....	46

## LISTE DES FIGURES

2.1 : Représentation schématique du mécanisme de l'acquisition du fer chez App .....	10
3.1 : Structure membranaire d'une bactérie Gram positive et d'une bactérie Gram négative .....	12
3.2 : Principales branches terminales du « general secretory pathway » (GSP) des bactéries Gram négatives .....	13
3.3 : Destinée des protéines possédant un peptide signal.....	14
3.4 : Structure générale d'un peptide signal.....	15
3.5 : Transformation du XP (substrat) en un produit coloré bleu par la phosphatase alcaline d' <i>E.coli</i> .....	16
3.6 : Schéma du vecteur pICOMII .....	18
3.7 : Structure modulaire de la protéine invasine.....	19
3.8 : Structure d'une intégrine typique liant l'invasine.....	19
3.9 : Modèle illustrant l'invasion de cellule eucaryote médiée par les intégrines .....	20
3.10 : Principe de la méthode de sélection de bactéries invasives développé par Worley.....	21
6.1 : Colonies forming unit recovered from the first invasion assay .....	45
6.2 : Colonies forming unit recovered from the second invasion assay .....	45
7.1 : Principe de la méthode de sélection immuno-magnétique de bactéries invasives..	54

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Apx	Toxines d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Réaction CAMP	L'activité hémolytique de la bêta-hémolysine de <i>Staphylococcus aureus</i> sur les érythrocytes de mouton est augmentée de façon synergique par un facteur extra-cellulaire produit par les <i>Streptococcus</i> du groupe B; le facteur est appelé CAMP. Il doit son nom aux initiales des chercheurs qui ont mis au point la technique: Christie-Atkins-Munch-Pertersen
CPS	Polysaccharides capsulaires
GSP	General secretory pathway
IgA	Immunoglobuline de type A
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharides
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
OMPs	Protéines de la membrane externe
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PhoA	Phosphatase alcaline
pTbp	Porcine transferrin-binding protein
RTX	Toxines formant des pores (repeats-in-toxin)
SOD	Superoxyde dismutase
Tbp	Protéines liant les transferrines

ufc	Unité formatrice de colonie
XP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### ***ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), une bactérie coccobacille Gram négative membre de la famille des *Pasteurellaceae*, est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une maladie qui entraîne d'importantes pertes économiques à l'industrie porcine mondiale. App est considérée comme un parasite obligatoire du tractus respiratoire du porc (1). La bactérie peut être isolée des cavités nasales, des amygdales, des cavités des oreilles et des poumons de porcs infectés (2-4). App n'est pas considérée comme une bactérie invasive intracellulaire bien que des cas d'ostéomyélite aient été rapportés chez des porcs. Il n'y a aucun autre hôte naturel connu, et la bactérie ne survie pas longtemps dans l'environnement (1). La transmission se fait par aérosol ou par contact direct avec des porcs infectés (5-7).

#### **1.1 Historique de la bactérie**

En 1957, Pattison *et al.* isolent, de lésions de pleuropneumonie porcine, une bactérie exigeante en nicotinamide-adenine-dinucléotide (NAD) qui sera dénommée sous le nom de *Haemophilus pleuropneumoniae* (8). En 1978, on rapporte des cas de pleuropneumonie causée par une bactérie non exigeante en NAD (9). En 1981, des études d'analogies phénotypiques et par hybridation ADN – ADN ont démontré que ces deux bactéries appartenaient à une espèce unique (10). De plus, cette nouvelle espèce est fortement apparentée à *Actinobacillus* et elle est éloignée de l'espèce type du genre *Haemophilus* (10). Un nouveau taxon est alors créé : *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Il y a deux biotypes d'App qui sont différenciés selon leur besoin de NAD (1). Les souches du biovar 1 ont besoin de NAD, tandis que les souches du biovar 2 peuvent synthétiser le NAD lorsqu'il y a présence de nucléotides pyridine spécifiques ou leurs précurseurs (11). Il y a 12 sérotypes pour le biotype 1 et 9 sérotypes pour le biotype 2 (12). Ces différents sérotypes sont déterminés en fonction du type d'antigènes de surface retrouvés au niveau des polysaccharides membranaires (13). Tous les sérotypes

sont hémolytiques et produisent une réaction CAMP positive en présence du *Staphylococcus aureus* bêta-hémolytique.

La pleuropneumonie peut être engendrée par tous les sérotypes bien qu'il y ait des évidences que certains sérotypes soient plus virulents que d'autres (14, 15). Ces variations peuvent être attribuées, du moins en partie, à la production des différentes combinaisons de toxines Apx (TABLEAU 1.1). Les sérotypes les plus virulents produisent les deux toxines ApxI et ApxII (14). Les autres facteurs, notamment la quantité de polysaccharides présents en surface, peuvent également contribuer aux différences de virulence entre les sérotypes et également entre les souches d'un même sérotype (16, 17).

**TABLEAU 1.1**  
**Toxines sécrétées par les sérotypes d'App (14).**

		Toxines sécrétées		
		Apx I	Apx II	Apx III
<b>Biovar 1</b>	<b>Sérotype</b>			
	1, 5, 9, 11	X	X	
	10	X		
	2, 4, 6, 8		X	X
	3			X
<b>Biovar 2</b>	7, 12		X	
	<b>Sérotype</b>			
	2, 4, 7		X	
	9	X	X	

## 1.2 Pathobiologie des infections à App

La pleuropneumonie peut survenir chez les porcs de tout âge. Il n'y a pas d'association connue avec des prédispositions virales ou bactériennes mais l'augmentation de l'incidence de la maladie est associée avec le stress (1). L'évolution de la maladie peut être aiguë ou chronique dépendamment du sérotype de l'infection, du statut immunitaire de l'hôte et du nombre de bactéries qui atteignent les poumons (15, 18).

Les signes cliniques sont nombreux lorsque la maladie est aiguë ou subaiguë : haute fièvre, augmentation du rythme respiratoire, toux, anorexie, ataxie, vomissements,

diarrhée et des problèmes de détresse respiratoire sévères avec cyanoses (1, 19). Une mousse hémorragique peut provenir de l'œdème pulmonaire et elle peut s'écouler par le nez et la bouche juste avant la mort de l'animal. La bactérie atteint particulièrement les poumons, les nodules lymphatiques et elle peut se répandre dans la cavité pleurale. Les animaux qui survivent à l'infection peuvent avoir une résolution complète de leurs lésions mais fréquemment, ils conservent des lésions nécrotiques ou des abcès encapsulés avec des tissus fibrineux (1, 19). La forme chronique est difficile à caractériser. On note des retards de croissance et une toux sporadique. De plus, la bactérie est présente dans des lésions pulmonaires nécrotiques et peut envahir les voies respiratoires antérieures et les amygdales.

### **1.3 La pathogenèse des infections à App**

Il y a trois phases de base dans la pathogenèse de la pleuropneumonie : la colonisation, l'évasion des mécanismes de défense de l'hôte et les dommages aux tissus de l'hôte. Le portrait complet de la pathogenèse d'App n'est pas encore bien compris mais certains facteurs sont reconnus pour contribuer à chacune de ses trois phases (1).

#### **1.3.1 Colonisation**

Une étape nécessaire pour une colonisation réussie et, ultimement, pour le développement de la maladie par les bactéries pathogènes est l'habileté à adhérer aux surfaces de l'hôte (20). Cette idée fondamentale a conduit à un grand nombre de recherches depuis les trente dernières années dont plusieurs avaient pour but de mieux comprendre comment les bactéries pathogènes adhèrent aux cellules hôtes. Suite aux différents travaux qui ont été réalisés, il y a eu un développement important des connaissances liées à la biosynthèse des adhésines, à la régulation de ces facteurs et les cibles des facteurs adhésines bactériens ont également identifiées (21-23). Les recherches qui ont été effectuées ont permis d'affirmer que ce ne sont pas toutes les adhésines qui sont essentielles à la virulence (24). Cependant, le rôle spécifique d'une adhésine particulière dans une maladie est difficile à définir parce qu'un pathogène particulier exprime plusieurs facteurs d'adhérence.

Des expérimentations *in vivo* de l'adhérence d'App ont révélé que la bactérie adhère surtout aux bronchioles et aux cellules épithéliales des alvéoles. L'adhérence est faible à l'épithélium de la trachée ou à celui des bronches (2). Bien que les lipopolysaccharides (LPS) et les lipooligosaccharides (LOS, les chaînes répétitives d'antigènes O des LPS sont alors absentes) sont reconnus comme jouant un rôle majeur dans la pathogenèse d'infections sévères causées par les Gram négatifs, comme la pleuropneumonie porcine, leur rôle dans l'adhérence est moins bien caractérisé (1). Pour App, la contribution des LPS dans la pathogenèse et/ou l'adhérence reste encore à élucider. Des recherches additionnelles sont nécessaires pour enrichir notre compréhension de la pathogenèse des infections d'App (1).

Après l'adhérence aux cellules de l'hôte, l'établissement de l'infection dépend de l'habileté de la bactérie à acquérir des nutriments essentiels à sa croissance. À l'intérieur de l'environnement du tractus respiratoire, une variété et une quantité d'hydrates de carbone sont disponibles et certains autres nutriments sont limités (25). L'habileté de surpasser les limitations nutritionnelles à l'intérieur de l'hôte peut être considérée comme un mécanisme pathogénique.

### **1.3.2 Évasion des mécanismes de défense de l'hôte**

L'efficacité de la défense de l'hôte contre les infections bactériennes dépend, entre autre, de l'évacuation rapide des bactéries du tractus respiratoire. Le système immunitaire respiratoire peut être non spécifique (fonctions mucocillaires, complément, phagocytes) et spécifique par les mécanismes lymphocytaires (1).

Les mécanismes d'évacuation rapide mucocillaires sont très importants pour la protection des poumons contre les infections. Les bactéries qui ne sont pas évacuées par les fonctions mucocillaires peuvent être éliminées par l'action des cellules phagocytaires. Cependant, App est en mesure de survivre plus de 90 minutes à l'intérieur d'un macrophage. Ce laps de temps permet la libération des toxines Apx par la bactérie et cela peut résulter en la lyse des macrophages. App produit plusieurs



facteurs qui peuvent contribuer à sa survie à l'intérieur des macrophages : capsule et LPS, Cu-Zn superoxide dismutase (SodC) (26), des protéines de stress (27) et de l'ammoniac (28).

Les facteurs majeurs impliqués dans la détérioration des fonctions de phagocytose des macrophages et des polynucléaires neutrophiles sont les trois toxines RTX (repeats-in-toxin) ApxI, ApxII et ApxIII. Elles sont produites en combinaisons variables par les différents sérotypes d'App (29) (voir TABLEAU 1.1).

### **1.3.3 Dommage aux tissus de l'hôte**

La plupart des conséquences pathologiques de la pleuropneumonie porcine peuvent être attribuées aux toxines Apx qui exercent des effets cytotoxiques directs ou indirects sur une variété de cellules (1).

## **1.4 Traitement et prévention**

Le traitement des porcs atteints de pleuropneumonie aiguë nécessite un antibiotique administré par voie parentérale (idéalement sélectionné après des tests de résistance de la souche isolée). Cependant, le traitement demande un travail intensif, beaucoup de temps et peut avoir un usage limité à cause de la progression rapide de la maladie (30). Des études sur le terrain et expérimentales ont mis en relief des évidences que l'infection avec un sérotype d'App procure une protection complète contre une infection subséquente avec un sérotype homologue et une protection partielle contre une infection hétérologue (18, 31). Cela suggère que la vaccination pourrait être une alternative intéressante aux traitements aux antibiotiques. Cependant, la diversité antigénique observée parmi les 15 sérotypes d'App a rendu difficile le développement d'un vaccin efficace et les vaccins existants contenant les bactéries entières procurent une protection limitée (32, 33). Il est donc pertinent de poursuivre les recherches visant à élucider l'ensemble des mécanismes de virulence d'App afin d'être en mesure de développer un vaccin plus efficace pour protéger la population porcine contre la pleuropneumonie.

## **CHAPITRE II**

### **LA VIRULENCE D'*ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

L'étude des facteurs de virulence bactériens a connu d'importants développements au cours des 15 dernières années. L'afflux massif de données de séquence d'ADN, l'utilisation de techniques comme le PCR, l'exploitation de méthodes de biologie et d'immunologie cellulaires, l'impact des méthodes de cristallographie et les études de structures moléculaires ont été appliquées à l'étude d'une grande variété de microbes pathogènes et aux gènes possédant des traits pathogènes (20). Des informations significatives ont émergé de ces données qui suggèrent qu'il y a un nombre de stratégies communes à une bactérie pour devenir pathogène.

La plupart des facteurs de virulence bactériens sont localisés à la surface de la bactérie ou sont sécrétés (20). Au cours des dernières années, il y a eu une explosion d'informations identifiant les facteurs bactériens qui sont nécessaires comme accessoires au transport des facteurs de virulence vers la surface cellulaire et dans l'environnement immédiat. Plusieurs de ces systèmes sont hautement homologues et les facteurs de virulence non reliés ont souvent des mécanismes de transport de base en commun (20).

Les recherches sur les facteurs de virulence d'App ont également connu des développements importants au cours des dernières années. Comme l'indique Jacques (34), l'infection par App est un processus qui implique plusieurs facteurs de virulence agissant seuls ou, plus souvent, conjointement pour permettre l'établissement de la bactérie chez son hôte. Le nombre élevé de facteurs de virulence potentiels reliés à cette pathologie complique la mise au point de vaccins parfaitement efficaces (35). Plusieurs composantes d'App, incluant les toxines appartenant au groupe de protéines RTX, les LPS, les polysaccharides capsulaires (CPS) et les protéines de membrane externe (OMPs) contribuent concrètement au processus d'infection (34).

## 2.1 Exotoxines de type RTX

Les bactéries pathogènes produisent de nombreuses substances qui sont directement ou indirectement toxiques pour les cellules hôtes. Les protéines bactériennes sécrétées, habituellement des enzymes, qui tuent les cellules hôtes à de très faibles concentrations sont désignées exotoxines (20). Les exotoxines jouent souvent un rôle central dans la pathogenèse d'une maladie bactérienne.

*App* produit quatre exotoxines de type RTX (ApxI à ApxIV) qui contribuent à sa virulence (voir TABLEAU 1.1). ApxI et ApxII sont produites par toutes les souches hautement virulentes en Amérique du Nord (14, 36). Les toxines Apx peuvent produire directement les symptômes ; des surnageants ne contenant aucune bactérie produisent des lésions pulmonaires similaires à celles générées lors d'une infection naturelle (14). ApxI et ApxII sont toutes les deux hémolytiques pour les érythrocytes et cytotoxiques pour les macrophages et les neutrophiles. L'organisation génétique de l'opéron *apxI* (*apxICABD*) suit le modèle général retrouvé chez les autres toxines RTX, comme l' $\alpha$ -hémolysine d'*E. coli* (*hlyCABD*). Le gène A encode pour le gène structural de la toxine, le gène C code pour un produit requis pour des modifications post-traductionnelles de la toxine et les gènes B et D sont nécessaires pour la sécrétion de la toxine (37). De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, les toxines RTX sont constituées de 4 domaines :

- Un domaine hydrophobe qui joue un rôle dans la formation des pores membranaires;
- Un domaine qui constitue environ 40 pour cent de la molécule qui semble nécessaire pour l'attachement aux cellules cibles;
- Un domaine formé par les séquences riches en glycine qui chélatent les ions calcium et qui interviennent dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires;
- Un domaine constituant un signal de sécrétion permettant le transport de la toxine au travers des enveloppes cellulaires.

Malgré leur rôle important dans les facteurs de virulence, les gènes de régulation concernant Apx sont peu connus (38). La production des toxines ApxI et ApxII est liée à la phase de croissance avec une production maximale de l'ARNm d'Apx lorsque la

densité cellulaire est élevée et que le taux de croissance diminue (39). Les toxines RTX jouent un rôle important pour contrer la première ligne de défense de l'hôte c'est-à-dire la phagocytose. En effet, elles contribuent à la destruction des macrophages et des neutrophiles de l'hôte (40). Les toxines RTX sont fortement immunogéniques et elles ont été étudiées comme des composantes potentielles pour l'élaboration d'un vaccin contre la pleuropneumonie porcine (14).

## 2.2 Lipopolysaccharides (LPS) et polysaccharides capsulaires (CPS)

D'autres substances bactériennes d'origine non protéiques, comme par exemple les LPS (endotoxines), n'utilisent pas directement un mécanisme enzymatique pour blesser les cellules hôtes et elles sont biologiquement actives à une concentration beaucoup plus élevée (20). Les LPS, qui sont des composantes communes des membranes cellulaires des bactéries Gram négatives, sont en mesure d'entraîner une grande variété d'effets physiopathologiques, comme des chocs endotoxiques, des lésions tissulaires et la mort cellulaire chez les animaux et les humains (41). Il a également été démontré que les LPS jouent un rôle dans l'adhérence d'App aux poumons et à la trachée (42).

La capsule purifiée d'App a été rapportée comme n'ayant pas d'activité biologique (43, 44). Cependant, il y a des évidences qui suggèrent que la capsule d'App est essentielle à la virulence *in vivo*. En effet, il a été démontré que la capsule protège la bactérie contre les anticorps et l'action bactéricide du complément et elle protège également contre la phagocytose par les leucocytes polymorphonucléaires (45, 46).

## 2.3 Pili et Fimbriae

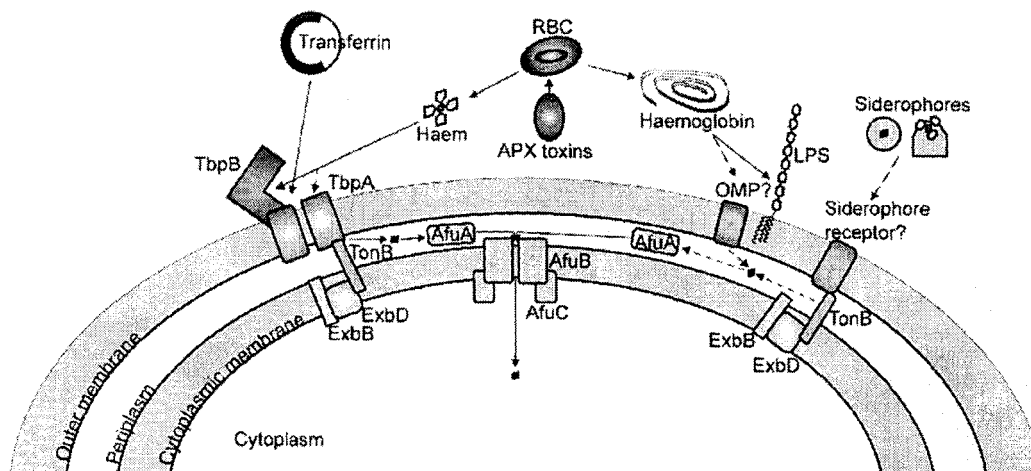
Une grande variété d'adhésines bactériennes est retrouvée chez plusieurs bactéries pathogènes. Ce sont des composantes de surface cellulaires ou annexes des bactéries qui facilitent l'adhérence à d'autres cellules ou à des surfaces inanimées. Certaines bactéries pathogènes ont été rapportées comme possédant plus d'une douzaine d'adhésines différentes. Des études ont révélé des ressemblances et des caractéristiques communes aux molécules d'adhésines ainsi que dans leur assemblage (47). Les adhésines peuvent

être divisées en deux groupes : les pili (fimbriae) et les adhésines non-pilus (afimbrial adhesins). Une des caractéristiques majeure retrouvée chez les divers pili est la conservation de la machinerie moléculaire nécessaire pour la biosynthèse du pilus et son assemblage à la surface bactérienne (48). Les fimbriae sont présents sur une grande variété de pathogènes et leur rôle dans l'adhérence a été bien défini (49). Les phénomènes liés à la régulation de l'expression de fimbriae par App sont encore mal compris (47).

## 2.4 L'acquisition du fer à l'intérieur de l'hôte

Toutes les bactéries ont besoin de fer pour croître et ce besoin est particulièrement important pour les microorganismes pathogènes qui doivent proliférer à l'intérieur d'un hôte mammifère. Cependant, le fer retrouvé chez ce type d'hôte est strictement séquestré par les protéines à hautes affinités pour le fer comme les transferrines et les lactoferrines. Ce phénomène rend l'acquisition du fer difficile pour la plupart des bactéries à l'intérieur de l'hôte. Les pathogènes qui vivent à la surface mucosale, dans les tissus ou à l'intérieur des cellules de l'hôte ont développé des mécanismes spécialisés pour obtenir le fer retrouvé à l'intérieur de l'hôte (50, 51). Par exemples, certaines espèces de *Neisseria*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* peuvent directement lier les protéines liant le fer de l'hôte comme les transferrines et les lactoferrines. Ces espèces utilisent une famille conservée de récepteurs (52-54) qui permettent d'obtenir le fer.

Les mécanismes pour surpasser les limitations en fer ont été démontrés comme étant d'une grande importance pour un grand nombre de bactéries pathogènes. Ces mécanismes ont été étudiés en détail chez App. En effet, App exprime plusieurs facteurs qui sont impliqués dans l'acquisition du fer (voir FIGURE 2.1).



**FIGURE 2.1 : Représentation schématique du mécanisme de l'acquisition du fer chez App tiré de Bossé et al. (1)**

Lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux carencés en fer, certaines espèces du genre *Actinobacillus* expriment deux protéines de membrane externe désignées par les acronymes TbpA et TbpB (Tbp : transferrin-binding protein). Les protéines TbpA et TbpB sont capables d'utiliser la transferrine porcine pour s'approprier leur fer. La protéine TbpA est une protéine transmembranaire et la protéine TbpB est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe grâce à sa partie lipidique. Ces deux protéines semblent agir en synergie pour capter le fer lié à la transferrine puis la protéine TbpA permettrait le transport du fer au travers de la membrane externe. Ensuite, le fer serait fixé sur une protéine périplasmique qui serait analogue à la protéine TonB de *E.coli*. Sauf exception, la culture d'App dans un milieu carencé en fer augmente la synthèse de Tbp ou de pTbp (porcine transferrin-binding protein) capables de fixer directement la transferrine porcine.

Tous les App produisant des toxines RTX hémolytiques sont également en mesure d'obtenir des produits de l'hème grâce à des hémolysines (29). Les LPS et les protéines de membranes externes sont impliqués dans la liaison de l'hémoglobine porcine (55, 56).

## **2.5 Autres facteurs de pathogénicité**

App produit une protéase immunoglobuline A (IgA), active sur les IgA du porc mais non sur les IgA de l'homme. Cette protéase pourrait intervenir dans la pathogénèse et sa spécificité serait un des facteurs expliquant que cette bactérie ne soit naturellement pathogène que chez le porc (57).

Les souches d'App (au moins celles des sérotypes 1, 3, 5, 7 et 8) produisent une Cu-Zn superoxyde dismutase (SOD). Les SOD sont des protéines qui catalysent la dégradation des radicaux libres hautement réactifs en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (58). La présence d'une région hydrophobe à l'extrémité amine terminale de la molécule semble suggérer que cette protéine est sécrétée. Le rôle exact de cette enzyme dans la virulence n'est pas connu mais elle pourrait conférer une résistance à la phagocytose (57). En effet, les SOD pourraient permettre à la bactérie de survivre à l'intérieur du phagocyte en éliminant les radicaux libres produits par ce dernier (57).

## CHAPITRE III

### LES PROTÉINES DE MEMBRANE EXTERNES, LES PEPTIDES SIGNAUX ET LEURS MÉTHODES D'IDENTIFICATION

#### 3.1 Les protéines de membrane externe et le peptide signal

Environ 20% des polypeptides synthétisés par une bactérie sont localisés partiellement ou complètement à l'extérieur du cytoplasme (59). Les différences de structures membranaires entre les bactéries Gram négatives et les Gram positives influencent grandement le mode de sécrétion des protéines (voir FIGURE 3.1). La plupart des polypeptides des bactéries Gram négatives atteignent leur destination finale par le « general secretory pathway » (GSP), dont la première étape consiste à l'insertion via une protéine SEC et la translocation de la protéine au travers de la membrane cytoplasmique (59) (voir FIGURE 3.2). Ensuite, une enzyme signal peptidase coupe les protéines qui possèdent une séquence signal. Dans le cas d'une bactérie Gram négative, les protéines sont libérées dans le périplasma où elles peuvent ensuite être intégrées ou exportées au-delà la membrane externe par une des nombreuses branches terminales du GSP. Dans le cas d'une bactérie Gram positive, les protéines dont la translocation est complète sont directement libérées dans le milieu externe étant donné qu'il n'y a présence que d'une seule couche membranaire.

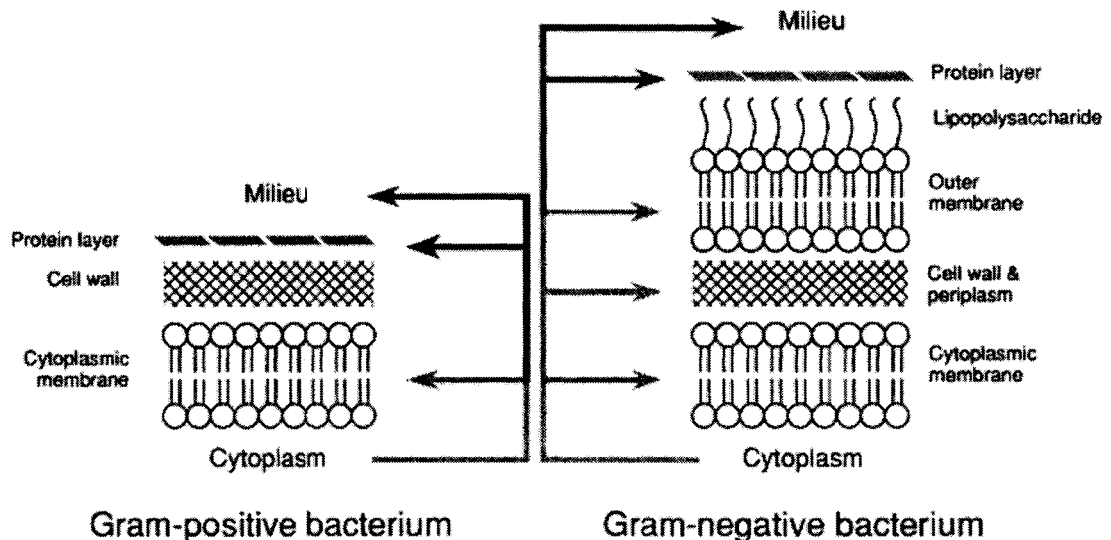
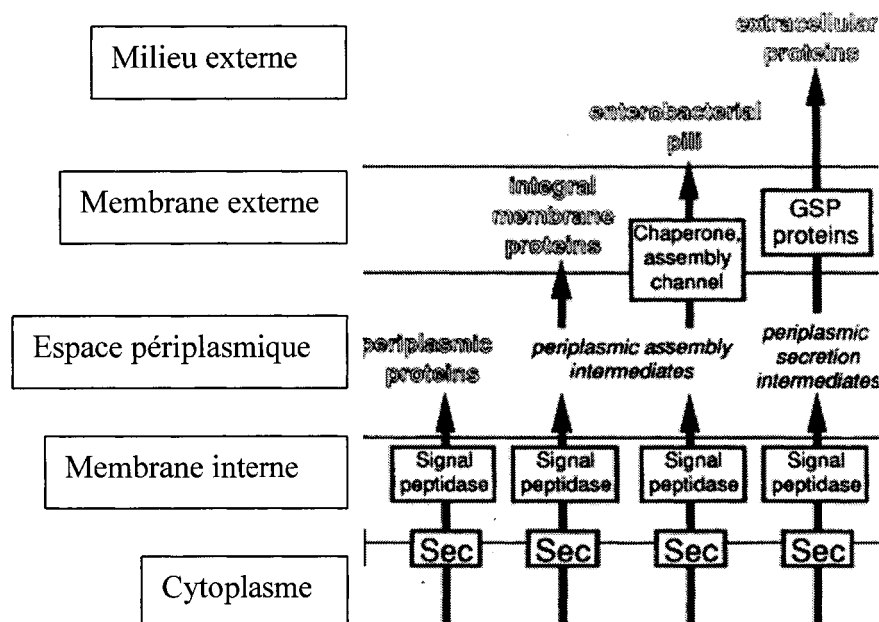


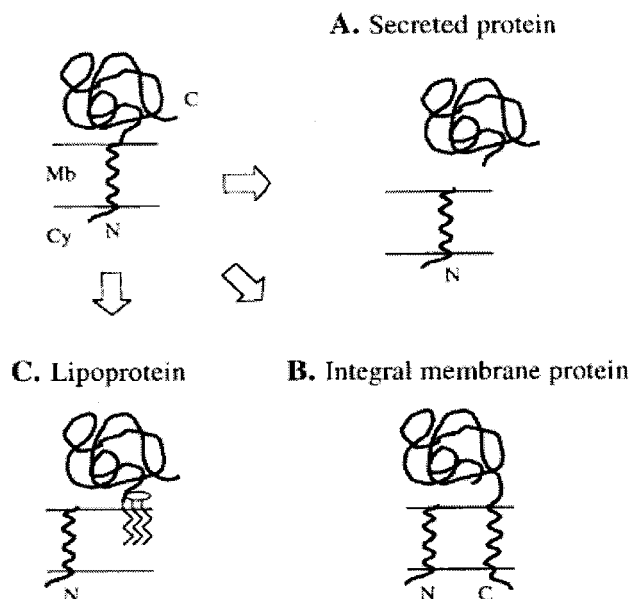
FIGURE 3.1 : Structure membranaire d'une bactérie Gram positive et d'une bactérie Gram négative. Tiré de Pugsley (59).





**FIGURE 3.2 :** Principales branches terminales du « general secretory pathway » (GSP) des bactéries Gram négatives. La figure illustre la plupart des processus d'exportation des protéines membranaires et de sécrétion de protéines extracellulaires. Tiré de Pugsley (59).

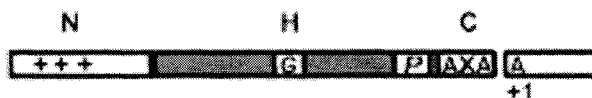
Dans la lignée des terminologies les plus largement acceptées, les protéines transportées par le GSP sont appelées protéines sécrétoires (ou protéines pré-sécrétoires si elles sont faites de précurseurs). Les protéines exportées sont partiellement ou complètement intégrées dans la membrane externe tandis que la sécrétion mène à libération extracellulaire. Les protéines sécrétoires sont différenciées des autres protéines par la présence d'une séquence signal sécrétoire (habituellement appelée peptide signal) caractérisée par une série d'au moins 10 acides aminés ininterrompus, essentiellement hydrophobes (59). Les différentes destinées des protéines possédant un peptide signal sont représentées à la FIGURE 3.3.



**FIGURE 3.3 :** Destinée des protéines possédant un peptide signal. Le peptide signal permet la translocation d'une protéine au-delà de la membrane bactérienne (image en haut à gauche : Mb = membrane, Cy = cytoplasme). Si elle possède un site de clivage spécifique, la protéine peut ensuite être clivée par une signalase peptidase (A.). Si la protéine ne possède pas de site de clivage spécifique, elle demeure insérée dans la membrane (B.). La protéine peut également être associée à un lipide transmembranaire (C.). Tiré de Gomez. (60)

Toutes les protéines sécrétoires possèdent un peptide signal qui a pour fonction primaire de diriger les protéines vers la membrane cytoplasmique (59). Il est important de noter que les peptides signaux sont exclusivement amine terminale, qu'ils ont une longue région hydrophobe (domaine H) qui est habituellement précédée par un ou plusieurs résidus chargés positivement dans une petite région généralement hydrophile (domaine N) ainsi que d'un site de clivage pour une protéase (domaine C) (voir FIGURE 3.4). De plus, il n'y a pas deux peptides signaux venant de protéines différentes qui possèdent exactement la même séquence. L'introduction de résidus chargés ou très polaires dans le domaine H ou l'élimination des acides aminés du domaine N réduits généralement l'efficacité de l'exportation (59). Tous les peptides signaux bactériens possèdent des caractéristiques de structure semblables. Cependant, ceux des protéines pré-sécrétoires venant de bactéries Gram positives tendent à être plus longs et à posséder un plus grand nombre de résidus basiques au niveau du domaine N (61).

### Secretory (Sec-type) Signal Peptides



**FIGURE 3.4 :** Structure générale d'un peptide signal. La plupart des peptides signaux possèdent une structure divisée en 3 parties: un domaine N chargé positivement (N), un domaine H hydrophobe (H), et un domaine C (C) qui comporte le site de clivage pour une protéase spécifique. Tiré de Tjalsma (62).

### 3.1 Les méthodes d'identification des peptides signaux

Des criblages de peptides signaux ont été effectués chez plusieurs bactéries. Certaines méthodes sont basées sur une approche phénotypique, d'autres sur des principes bio-informatiques et certaines combinent les deux (60) .

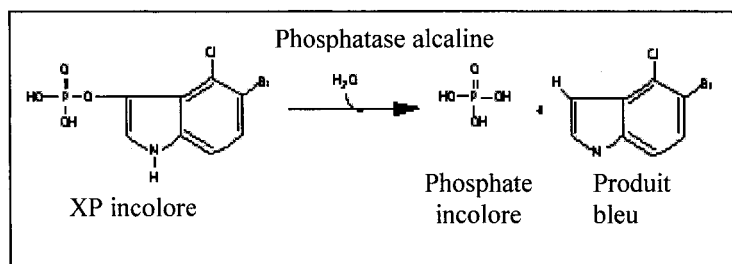
#### 3.1.1 Méthodologie phoA

Des méthodes d'identification de protéines d'exportation utilisant la phosphatase alcaline (PhoA) ont été couramment employées dans le passé. La technologie de fusions de gènes a été utilisée avec succès pour identifier plusieurs protéines sécrétées chez plusieurs espèces bactériennes dont *Helicobacter pylori* (63), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (64) et *Staphylococcus aureus* (65).

Il est à noter que la fusion transcriptionnelle nécessite deux conditions pour être fonctionnelle : le gène inséré doit posséder un promoteur et une séquence signal. Le promoteur du gène inséré doit être dans la bonne orientation par rapport à *phoA* et dans le bon cadre de lecture (en phase avec la *phoA*). Le promoteur est essentiel pour que la transcription du gène ait lieu. Après transcription, la traduction débute au niveau de la séquence signal. Cette courte séquence d'environ 15 à 25 acides aminés permet l'exportation du polypeptide codé par le gène inséré. Après la traduction, cette séquence est retirée par une peptidase signal. Le polypeptide en cours de synthèse sera transporté

dans les différents compartiments cellulaires et pourra être acheminé vers sa destination finale. Cette dernière peut être le milieu extracellulaire, la surface bactérienne, la membrane interne ou l'espace périplasmique.

Le mécanisme de transport général du polypeptide comportant une séquence signal est le suivant : 1) la protéine sécrétée est dirigée grâce à la séquence signal et relâchée après excision de la séquence signal par la peptidase signal de type I ; 2) les protéines intégrées à une membrane sont modifiées et deviennent des lipoprotéines dont la partie lipidique sert à ancrer la macromolécule (60). Puisque le gène *phoA* est contigu au gène inséré, la transcription et la traduction résultent en la création d'une protéine de fusion. La phosphatase alcaline d' *E.coli*, une phosphomonoestérase impliquée dans le métabolisme des polyphosphates (66), n'est active qu'après son passage à travers le cytoplasme. On peut alors vérifier la présence de la protéine de fusion en ajoutant, au milieu de culture, le substrat de la phosphatase alcaline appelé XP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, à une concentration de 250 µg / mL). Les colonies bactériennes contenant une protéine de fusion hors du cytoplasme pourront transformer le XP en un produit coloré bleu (voir FIGURE 3.5). Les colonies blanches contiennent une protéine de fusion non exportée. Un fait intéressant est la présence de colonies avec un halo bleu. Les protéines de fusion sécrétées dans l'environnement extracellulaire ou à la surface bactérienne diffusent dans le milieu : le XP de la gélose est alors converti en un produit bleu encerclant la colonie bactérienne.



**FIGURE 3.5 : Transformation du XP (substrat) en un produit coloré bleu par la phosphatase alcaline d' *E.coli*.**

Un des désavantages majeurs des méthodes utilisant la technologie PhoA est qu'elles ne permettent pas d'identifier spécifiquement les séquences reliées aux protéines de membrane externe. En effet, elles isolent également les séquences reliées aux protéines

de la membrane interne des bactéries (membrane cytoplasmique). Ce type de séquence ne contient pas de site de clivage protéolytique et les protéines sont alors associées de façon permanente à la membrane interne bactérienne ce qui les mets hors d'atteinte pour les anticorps (voir FIGURE 3.2). Au contraire, les protéines exportées contiennent souvent une séquence signal contenant un site de clivage protéolytique (peptide signal). Ce site est clivé au niveau de la membrane interne bactérienne avant que la maturation se poursuive dans l'espace périplasmique entre la membrane interne et la membrane externe bactérienne. La protéine peut alors rester dans le périplasme, demeurer insérée dans la membrane externe ou être sécrétée dans le milieu extracellulaire ce qui la rend potentiellement immunogène et donc d'intérêt pour l'élaboration de vaccins.

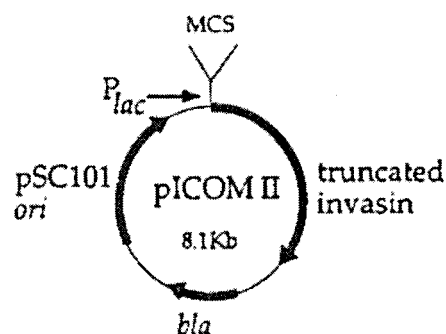
### 3.1.2 Méthode bio-informatique

Au milieu des années 1990, le développement des méthodes de prédiction de peptides signaux à mener à l'utilisation des technologies informatiques reliées aux algorithmes (67, 68). Cela a permis d'augmenter significativement la performance des méthodes de prédictions (69). Une des méthodes les plus utilisées, SignalP, permet de prédire la présence des sites de clivage pour la peptidase signal I (70). SignalP est composé de deux systèmes de prédictions basées sur un réseau neural et un modèle d'algorithmes de Markof (70).

Une source d'erreur de cette méthode de prédiction est que les protéines clivées peuvent subir une maturation suite à leur clivage par la peptidase signal I (70). Cependant, le principal désavantage des méthodes utilisant un support informatique est le fait qu'elles ne peuvent détecter seulement les protéines sécrétées par les GSP (60). Plusieurs autres protéines peuvent être sécrétées par d'autres types de mécanismes de transport. Par exemple, un processus d'exportation lié à la pseudopiline, le « twin-arginine translocation Tat pathway » a été identifié chez *Bacillus* (71). Certaines protéines peuvent également emprunter des transporteurs de type ABC utilisant des cassettes liant l'adénosine triphosphate (72).

### 3.2.3 Méthodologie utilisant l'invasine

Pour faciliter l'identification des protéines de surface, un nouveau système de fusion de gène permettant de sélectionner exclusivement les séquences de peptide signal clivable a été développé (73). La méthodologie qui y est décrite se base sur le vecteur pICOMII (voir FIGURE 3.6). Ce vecteur a été construit à partir d'un clonage de l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* et d'un vecteur basse copie (74). Les 148 acides aminés de l'extrémité amine de l'invasine ont été retirés lors du clonage (Inv tronquée). Cette modification empêche l'exportation de l'invasine tronquée au delà de la membrane interne bactérienne. Une séquence d'ADN permettant l'exportation de l'invasine (peptide signal) doit être clonée en amont de l'invasine tronquée (MCS) afin que la protéine soit exprimée en surface de la bactérie. Après transformation du vecteur pICOMII recombinant dans une souche d'*E.coli*, le phénotype d'invasion est acquis si l'invasine est exposée à la surface externe de la bactérie.

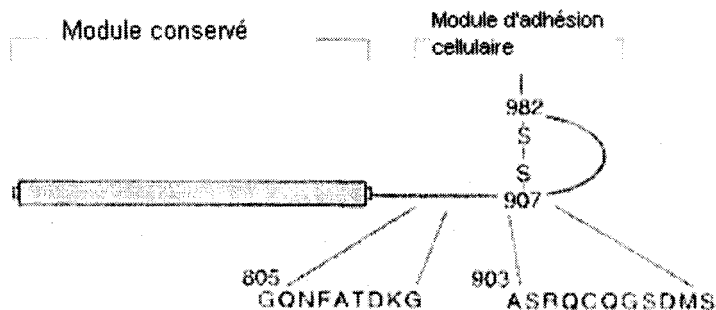


**FIGURE 3.6 :** Schéma du vecteur pICOMII. On y retrouve l'invasine tronquée (truncated invasin) ainsi qu'un site de clonage (MCS) (73).

### 3.2.4 L'invasine

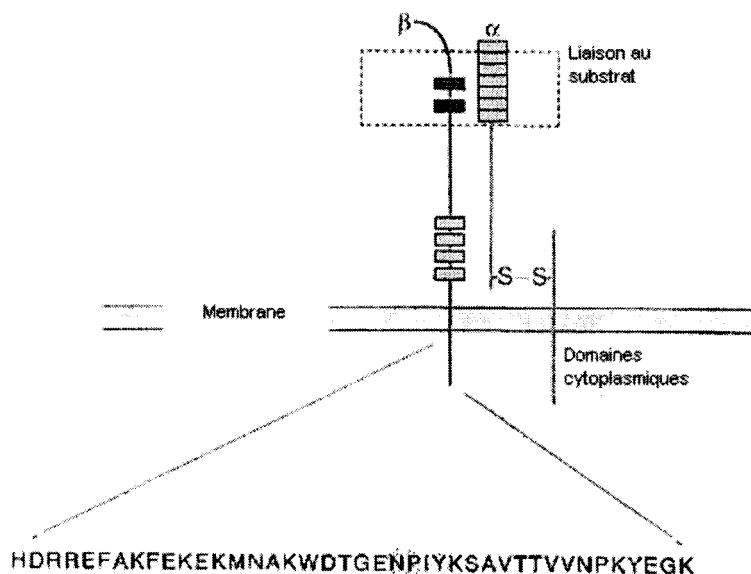
Le système d'invasion le plus étudié est sans doute celui qui est retrouvé chez *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica* (75). Ces espèces bactériennes possèdent un gène chromosomique codant pour une protéine de 90 kDa retrouvée sur la membrane externe, l'invasine (voir FIGURE 3.7), qui permet l'attachement et l'entrée dans des cellules non-phagocytes (76). L'extrémité amino-terminale de cette protéine est insérée dans la membrane externe alors que l'extrémité carboxy-terminale est exposée à la surface bactérienne. Le locus chromosomique *inv* (pour invasion) est présent chez

toutes les souches de toutes les espèces du genre *Yersinia* mais il n'est fonctionnel que chez *Yersinia pseudotuberculosis* et chez les souches pathogènes de *Yersinia enterocolitica*.



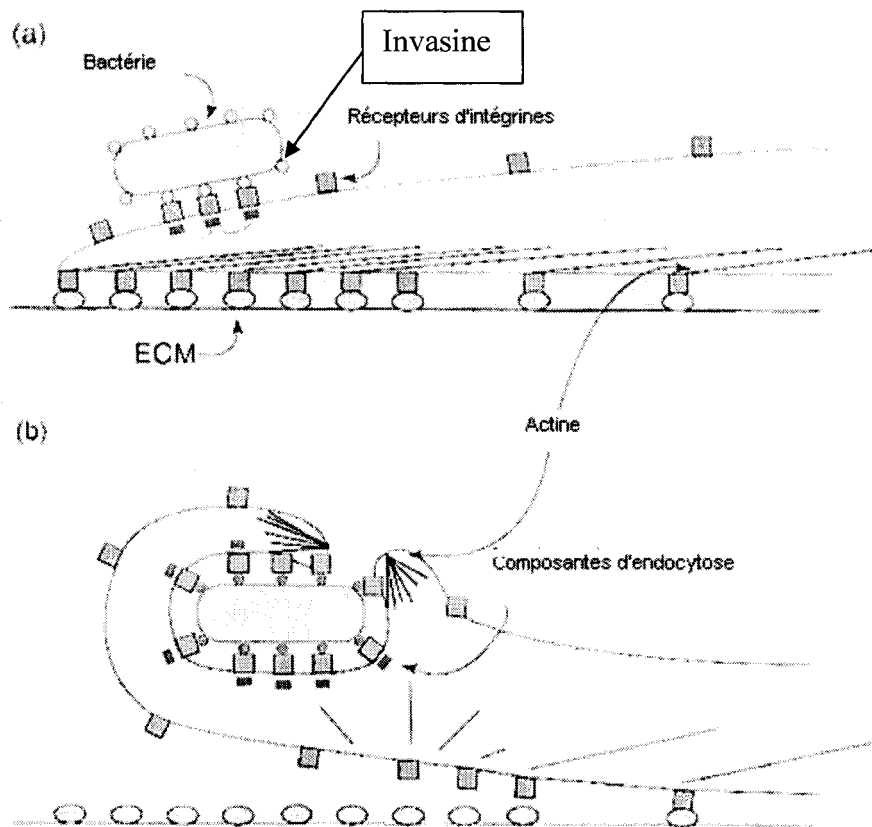
**FIGURE 3.7 : Structure modulaire de la protéine invasive. Tiré de Isberg (77).**

Le travail réalisé par Isberg et ses collègues a démontré que l'invasine s'attache étroitement avec les intégrines de la famille  $\beta 1$  (voir FIGURE 3.8). Ce sont des molécules de l'hôte qui lient les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine à la surface basolatérale des cellules épithéliales (78).



**FIGURE 3.8 : Structure d'une intégrine typique liant l'invasine. Tiré de Isberg (77).**

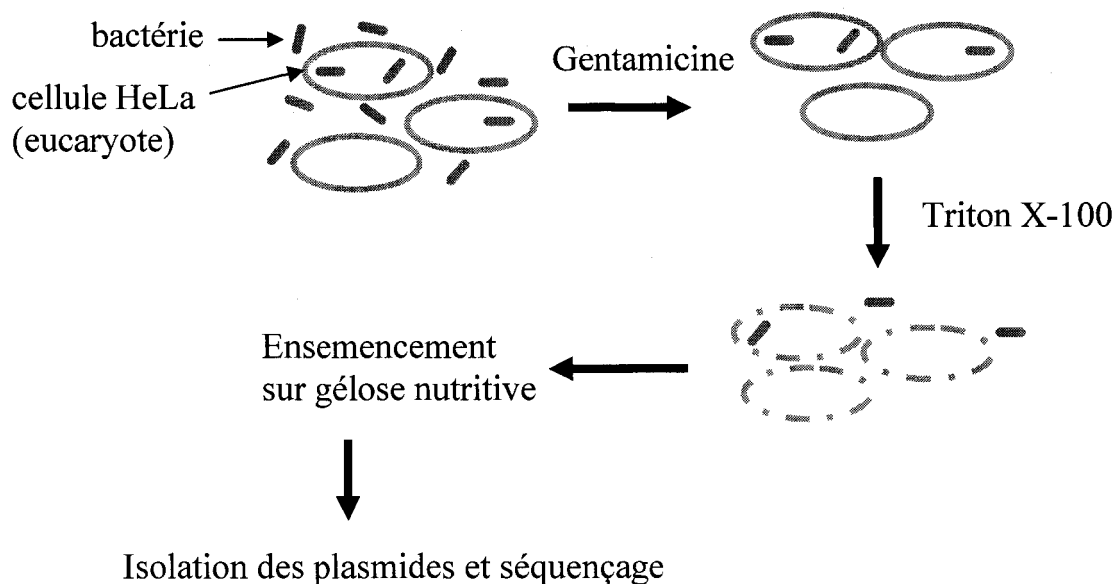
En s'attachant étroitement aux intégrines, l'invasine permet l'entrée bactérienne par un mécanisme du type « fermeture éclair » en attachant la membrane de la cellule hôte autour de la bactérie au fur et à mesure de sa pénétration (78). Ce mécanisme d'endocytose est représenté à la FIGURE 3.9. L'invasine seule est suffisante pour produire cette invasion ; l'invasine clonée dans une souche d'*E.coli* non-invasive ou une invasine purifiée couplée à une particule inerte comme une bille, entraîne la pénétration de la particule dans la cellule hôte. L'actine de l'hôte est nécessaire pour la pénétration (79). L'action des protéines d'actine permet la déformation du cytosquelette de la cellule afin de permettre l'endocytose de la bactérie. Cependant, les réarrangements du cytosquelette ne sont pas dramatiques et ils disparaissent quelques minutes après l'entrée de la bactérie (80).



**FIGURE 3.9 :** Modèle illustrant l'invasion de cellule eucaryote médiée par les intégrines. En (a) ; adhésion de la bactérie aux récepteurs d'intégrines la cellule eucaryote. En (b) ; endocytose de la bactérie par la cellule eucaryote. Tiré de Isberg (77).



Plusieurs expérimentations d'invasion avec des bactéries ont été effectuées dans le passé. Généralement, les techniques utilisent des cellules hôtes de type HeLa pour effectuer la sélection des bactéries invasives (81-83). La méthode d'isolation développée par Worley (73) permettant l'isolation de bactéries exprimant l'invasine consiste à mettre en contact une banque de clones contenant le vecteur pICOMII ligué avec des fragments d'ADN de *Salmonella typhimurium* avec une culture cellulaire de type HeLa. La banque de clones est utilisée pour infecter les cellules HeLa et par la suite, les cultures sont traitées avec un antibiotique spécifique aux bactéries, la gentamicine, afin de tuer les bactéries qui n'ont pas pénétré à l'intérieur des cellules HeLa. Les cellules HeLa sont ensuite lysées avec un détergent qui s'attaque spécifiquement aux membranes eucaryotes, le Triton-X-100. Cela permet de libérer les bactéries invasives qui ont pénétrées la membrane des HeLa grâce au clonage d'un peptide signal (voir FIGURE 3.10). L'analyse de l'ADN des bactéries invasives récoltées a révélé que la technique permettait l'isolement d'une variété de protéines périplasmiques et de protéines associées à la membrane externe (73).



**FIGURE 3.10 :** Principe de la méthode de sélection de bactéries invasives développée par Worley.

## **CHAPITRE IV**

### **LES VACCINS ET APP**

#### **4.1 L'élaboration de nouveaux vaccins plus efficaces**

L'identification et la caractérisation des protéines membranaires sont souvent à la base de l'élaboration des vaccins (84). Une meilleure compréhension de la régulation de l'expression des protéines de surface pourrait nous permettre d'envisager le développement de nouveaux vaccins. En effet, les vaccins présentement disponibles pour protéger les élevages de porcs contre la pleuropneumonie ne sont pas complètement efficaces (35). Les individus vaccinés peuvent quand même être touchés par la maladie. Des données sur les facteurs de virulence méconnus, comme par exemple les protéines de surface, seraient grandement utiles à la conception de vaccins plus efficaces.

De nombreux travaux ont été consacrés à la vaccination mais de nombreux problèmes restent à résoudre avant d'obtenir le vaccin idéal :

- Les mécanismes immunitaires responsables de la protection ne sont pas parfaitement élucidés. Classiquement, il est admis que la protection vis-à-vis d'App est à médiation humorale toutefois, ni les anticorps sériques ni les anticorps présents dans le liquide de lavage trachéo-bronchique ne sont aptes à protéger des porcs et le rôle des lymphocytes T pourrait être primordial.
- Les facteurs de virulence d'App sont nombreux ce qui complique la mise au point de vaccins parfaitement efficaces.
- Le manque d'efficacité d'une vaccination par voie parentérale peut s'expliquer par un manque de stimulation du système immunitaire associé aux muqueuses respiratoires et qui jouent certainement un rôle primordial dans la protection. L'administration locale (par aérosol ou par voie entérale) d'une souche d'App vivante ou inactivée induit une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire au niveau de l'appareil respiratoire mais, une vaccination par aérosol n'est pas plus efficace qu'une vaccination par voie parentérale et une vaccination par voie orale ne supprime pas le développement de lésions pulmonaires.

## 4.2 Les types de vaccins disponibles présentement

Les vaccins d'App tués (particulièrement les sérotypes hétérologues) sont inadéquats pour la prévention des infections (85). Ces vaccins bactériens induisent une réponse immunitaire vis-à-vis de divers constituants bactériens mais ne contiennent pas les toxines Apx. En effet, lorsque la bactérie est tuée, les toxines Apx sont absentes ou dénaturées et elles n'induisent donc pas la production des anticorps nécessaires à la protection de l'hôte (86, 87). Cependant, ce type de vaccin permet de réduire l'intensité des signes cliniques, le taux de mortalité, les retards de croissance, le coût des traitements mais leur efficacité est insuffisante pour prévenir l'infection. Il entraîne une protection limitée aux sérovars inclus dans la préparation vaccinale et ce sont souvent des autovaccins.

Les vaccins vivants se sont cependant démontrés efficaces (88-90) à cause de l'expression native des toxines Apx qui entraînent la production d'anticorps qui préviennent la lésion des poumons et donc l'apparition de la maladie. De plus, les vaccins vivants ne sont pas nécessairement spécifiques au niveau du sérotype mais ils sont spécifiques aux toxines. Les résultats de terrain montrent qu'ils permettent de réduire l'intensité des signes cliniques, de réduire la sévérité des lésions, d'augmenter les performances et de réduire le coût des traitements. Expérimentalement, les résultats sont similaires mais ces vaccins n'empêchent pas toujours la colonisation des voies respiratoires par la souche d'épreuve (32).

## **CHAPITRE V**

### **PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

#### **5.1 Problématique**

La diversité des mécanismes utilisés par App pour induire la pleuropneumonie chez le porc entraîne des difficultés pour la mise au point d'un traitement préventif efficace. En effet, pour être en mesure de survivre dans les poumons de son hôte, App doit mettre en œuvre une série de mécanismes afin d'être en mesure de contourner les défenses immunitaires naturelles du porc. Ces nombreux et diversifiés mécanismes de virulence sont encore méconnus (34). C'est pourquoi la prévention par l'utilisation de vaccins efficaces nécessite un approfondissement des connaissances liées aux facteurs de virulence et aux protéines susceptibles de stimuler le système immunitaire porcin.

#### **5.2 Hypothèses et objectifs**

Comme c'est le cas pour plusieurs bactéries, le séquençage du génome d'App est pratiquement terminé. Les recherches doivent maintenant chevaucher la génomique et la protéomique afin de déterminer les liens entre les séquences d'ADN et les protéines produites. Ce projet de recherche s'inscrit dans cette perspective en se concentrant plus spécifiquement sur l'identification de séquences d'ADN codant pour des peptides signaux. Les peptides signaux permettent la translocation d'une protéine au-delà de la membrane bactérienne qui devient alors une OMP.

Les éléments présentés dans ce document se concentrent sur l'identification des OMPs qui, de par leur localisation à la surface bactérienne, sont en contact direct avec l'environnement immédiat de la bactérie c'est-à-dire avec son hôte. Elles sont donc une cible potentielle pour les anticorps produits par le système immunitaire de l'hôte. Une meilleure identification des protéines immunogènes pourrait permettre la mise au point de nouveaux vaccins plus efficaces contre la pleuropneumonie porcine. De plus, les OMPs ont souvent un rôle primordial à jouer dans la virulence, d'où l'importance de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre leur mode de fonctionnement.

En se basant sur les résultats obtenus par Worley (73), ce projet de recherche possède les objectifs suivants ; à court terme, identifier les séquences de peptides signaux d'App qui permettent à cette bactérie d'exporter des protéines à sa surface. Grâce aux banques de séquences d'ADN d'App, il sera ensuite possible d'identifier des gènes possédant une région codante pour une séquence d'exportation. Par la suite, des analyses bio-informatiques des séquences ainsi obtenues permettront de déterminer le rôle potentiel de ces gènes chez App. À plus long terme, le projet de recherche vise à élucider les mécanismes d'expression et de régulation géniques des protéines de membranes externes immunogènes chez App. De par l'identification de nouvelles protéines présentant un potentiel antigénique et, possiblement, de par le ciblage de nouveaux facteurs de virulence, l'objectif ultime du projet est de mettre au point un vaccin efficace qui protégerait l'importante industrie porcine mondiale de la pleuropneumonie porcine. De plus, l'étude des facteurs de virulence des protéines de surface favoriserait le développement de meilleurs tests diagnostiques pour la pleuropneumonie porcine (92). La mise en évidence de certaines protéines de surface pourrait également aider au développement de nouveaux diagnostics sérologiques (types de souches d'App) pour l'industrie porcine. Des diagnostics plus rapides permettraient une intervention plus efficace au niveau des porcs infectés.

### **5.3 Description des différents chapitres du mémoire**

Le chapitre VI correspond au corps de mémoire présenté sous forme d'article scientifique. Le résumé en langue française de ce dernier est présenté au début de ce document. Au chapitre VII, une discussion sur les différents résultats obtenus est présentée. Finalement, une conclusion générale de l'ensemble des éléments présentés dans ce mémoire est effectuée au chapitre VIII.

**CHAPITRE VI**  
**ARTICLE SCIENTIFIQUE**

**6.1 Screening for surface proteins coding genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae* using a cell-invasion selection process.**

Vincent Roy<sup>1</sup>, John Nash<sup>2</sup>, and Marc Sirois<sup>1§</sup>,

<sup>1</sup> Laboratoire de génomique bactérienne, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351  
Boulevard des Forges, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

<sup>2</sup>Pathogen Genomics Group, Institute for Biological Sciences, National Research  
Council Canada, 100 Sussex Drive, Ottawa. Ontario, Canada, K1A 0R6

<sup>§</sup>Corresponding author

Email addresses:

VR: [vincent\\_roy@uqtr.ca](mailto:vincent_roy@uqtr.ca)

JN: [john.nash@nrc-cnrc.gc.ca](mailto:john.nash@nrc-cnrc.gc.ca)

MS: [marc\\_sirois@uqtr.ca](mailto:marc_sirois@uqtr.ca)

## 6.2 Abstract

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a disease that contributes to important economic losses to the swine industry worldwide. Infection by *A. pleuropneumoniae* is a multifactorial process governed by many virulence factors acting alone or, more often, in concert to establish the pathology in the porcine host. It is understood that several virulence factors components are still unknown. Almost all bacterial virulence factors are localized to the cell envelope or secreted. In order to preferentially identify the subset of secreted protein, a gene fusion system using the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein was designed. The method is based on the pTBIInv vector generated by cloning a deletion derivative of invasin who cannot be translocated past the inner membrane. Because it is not exported over the inner membrane, the truncated invasin cannot promote invasion. However, the truncated invasin can become surface exposed and promote invasion when fused to heterologous proteins at this site that can promote export. Bacteria expressing such fusion are easy to identify with simple gentamicin protection assays.

Plasmids were purified from invasion positive colonies. This analysis yielded a total of 33 proteins cloned from *A. pleuropneumoniae* fragments restoring successfully the invasion phenotype. The ability of these proteins to direct invasin to the outer membrane is likely due to the presence of an export signal. Some fragments fused are coding for a methionine synthase II (cobalamin-independent), permease component of ABC-type multidrug transport system, NusA protein and different component of ABC-type transport system.

This approach will complement ongoing sequencing projects for several reasons. Leader peptides share little primary sequence homology and are difficult to reliably identify by automated procedures. The invasin selection identifies functional signals not merely homology, and thus can be used to definitively assign subcellular location to the proteins encoded by uncharacterized open reading frame. This invasin gene fusion method shall be a useful tool for the identification of surface exposed proteins and potential virulence factors from various organisms.

### 6.3 Background

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), a Gram negative coccobacillus member of the *Pasteurellaceae* family, is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a disease responsible for important economic losses to the swine industry worldwide. Infection by App is a multifactorial process governed by many virulence factors acting alone or, more often, in concert to establish disease in the porcine host [1]. Several bacterial components, including toxins that belong to the RTX (repeats-in-toxin) group of proteins (ApxI-ApxIV), lipopolysaccharides (LPS), capsular polysaccharides (CPS), and some Outer Membrane Proteins (OMPs) appear to contribute to the disease process [1-3]. The complexity of the pathogenesis mechanisms causes many complications for the development of a complete efficient vaccine [4].

Almost all bacterial virulence factors are localized to the cell envelope or are secreted [5]. This group includes proteins involved in adhesion to and invasion of eukaryotic cells, components of type I and type III exporters, toxins, proteases and almost all components of fimbrial operons. Exported proteins contain a signal sequence at their



amino terminus that targets them for export through the General Secretory Pathway (GSP). Signal sequences share little primary sequence homology, but their overall characteristics are conserved, permitting functional complementation. Signal sequences that include a peptidase cleavage site are proteolytically removed at the inner membrane as the resulting mature proteins are released into the periplasmic space. These proteins can remain in the periplasm, inserted into the outer membrane or be secreted in the extracellular space. In contrast, proteins that contain non-cleavable signal sequences remain permanently associated with the inner membrane [6].

The primary established methods for the identification of exported proteins are based on fusions to alkaline phosphatase (PhoA) [7-9] or beta-lactamase (Bla) [10, 11]. They screen and select for signal sequences at large. A sequence does not require a cleavable signal sequence to be isolated. Thus, non-cleavable signal sequences as well as generally hydrophobic stretches of amino acids are identified with these approaches [8, 12, 13]. In fact, the majority of the clones obtained with these methods does not contain proteins that are released from the inner membrane [9, 14].

To preferentially identify a subset of secreted proteins, a fusion system was previously designed by Worley *et al.* [15]. This fusion system uses the *Yersinia pseudotuberculosis* outer membrane protein invasin [16]. When invasin inserts into the outer membrane, its carboxyl terminus becomes surface exposed and can contact host-cell terminus integrins [17], promoting bacterial internalization by the eukaryotic cell [18]. The method is based on the pICOMII [15] vector. This vector was generated by cloning a deletion derivative of invasin ( $\Delta$ Inv) into pWKS30 [19]. The truncated protein lacks the 148 amino terminal residues of the full-length invasion and therefore cannot be translocated

past the inner membrane, thus cannot promote invasion. However, when fused to heterologous polypeptides which can complement the secretion signal, it can promote invasin exportation [20]. Bacteria expressing such fusions are easy to identify with a simple gentamicin protection essays. We took advantage of this method to create a new vector, pTBIInv.

## 6.4 Results

### 6.4.1 Constructions and library enrichment

The vector pTBIInv was generated by cloning a deletion derivative invasin into pTrueBlue-rop vector (Genomics one corp.). The plasmid pTBIInv has a low copy number and contains the *lac* promoter upstream of the invasin gene. *App* genomic DNA fragments were cloned upstream of an N-terminally truncated invasin gene to create a library of plasmid-encoded invasin fusions. This plasmid library was introduced into *Escherichia coli* DH5alpha (Invitrogen), and the transformants were screened for invasion activity (see figure 6.1). As negative control for invasion, self-ligated pTBIInv vector was used, without any modification. The survivors of one invasion essay were pooled and used to repeat the infection of HeLa cells (see figure 6.2). In total, we isolated 300 invasion positive colonies.

### 6.4.2 Sequence analysis

Plasmids were purified from invasion positive colonies. A total of 41 plasmids were sequenced and mapped to the *A. pleuropneumoniae* genome to try to identify the gene randomly cloned upstream of the invasin gene. This analysis yielded a total of 33 proteins cloned from *App* fragments restoring successfully the invasion phenotype, while

the majority of remaining sequences did not produce high-scoring BLAST hits to the App genome. Eliminating the redundant BLAST hits reduced the list to 27 unique App-invasin proteins. The ability of these proteins to direct invasin to the outer membrane is likely due to the presence of an export signal. Of the 27 proteins identified in the invasion screen, 5 displayed a predicted cleavable N-terminal signal peptide [21]. Some properties of 6 clones identified are described below and are summarized in Table 1.

22 proteins were identified in the invasion screen that lacked a predicted export signal. These proteins may possess noncanonical export signals not identified by the methods used, or else incorrect assignment of start sites may have caused their true export signals to be missed. Alternatively, they may represent false positives associated with the invasin screen. To explore these possibilities, these proteins were selected for ulterior examination.

## **6.5 Discussion**

### **6.5.1 Analysis of clones**

One fragment fused to  $\Delta$ Inv encodes a App methionine synthase II (cobalamin-independent). The App gene browser matches the sequence on the ap0953 gene. Cobalamin-independent methionine synthase (MetE) catalyzes the final step of de novo methionine synthesis using the triglutamate derivative of methyltetrahydrofolate as methyl donor and homocysteine (Hcy) as methyl acceptor [22]. Two apparently unrelated families of proteins catalyze this reaction: cobalamin-dependent methionine synthase (MetH) and cobalamin-independent methionine synthase (MetE) [23]. Organisms that synthesize or transport vitamin B12 (cobalamin) encode the cobalamin-

dependent enzyme whereas organisms that cannot obtain B12 encode only the cobalamin-independent enzyme [23]. *Escherichia coli* and many other species of bacteria express both enzymes, but mammals, plants and yeasts utilize only cobalamin-independent methionine synthase [23].

The second clone having a predicted cleavable signal sequence, VR2, encoded for an App permease component of ABC-type multidrug transport system. Bacterial resistance to macrolides, a type of antibiotics, is mainly conferred by three different mechanisms: (i) modification of the 23S rRNA target site by different methyltransferases; (ii) efflux of the drug mediated by ATP-binding cassette (ABC)-type transport systems or by exporters belonging to the major facilitator superfamily (MFS); (iii) inactivation of the molecule by different enzymes such as esterases, hydrolases, transferases and phosphorylases [24, 25]. This type of transport system has also been identified in *Clostridium botulinum*, a Gram-positive anaerobic spore-forming bacteria and is distinguished by its clinical significance. Growing cells secrete botulinum neurotoxin (BoNT), the most poisonous of all known poisons [26]. The bacterium harbors a 16.3 kb plasmid containing similar genes to those that encode the ABC-type multidrug transport ATPase, and permease. The presence of ABC-type multidrug transport ATPase, and permease suggests putative involvement of efflux pumps in bacteriocin production, modification, and export in *C. botulinum* [26]. The App gene browser matches the clone VR2 sequence with on the ap0939 (dppC) gene. The genome sequence of *Lactococcus lactis* revealed the presence of a putative peptide-binding protein-dependent ABC-transporter (Dpp) [27]. The genes for two peptide-binding proteins (dppA and dppP)

precede the membrane components, which include two transmembrane protein genes (dppB and dppC) and two ATP-binding protein genes (dppD and dppF) [27].

The VR3 clone has 87% identity with the NusA *Haemophilus ducreyi* protein. It also shares homology with *Haemophilus influenzae* transcription elongation factor NusA [28]. The App gene browser matches the sequence on the ap0708 (nusA) gene. NusA is a key regulator of bacterial transcriptional elongation, pausing, termination and antitermination, yet relatively little is known about the molecular basis of its activity in these fundamental processes [29]. Synthesis of ribosomes in *Escherichia coli* requires an antitermination system that modifies RNA polymerase to achieve efficient transcription of the genes specifying 16S, 23S, and 5S rRNA [30]. This modification requires nucleotide signals in the RNA and specific transcription factors, such as NusA and NusB [30]. Bacterial RNA polymerases (RNAPs) are capable of producing full-length transcripts in the absence of additional factors using in vitro assays [31]. However, in vivo RNAP can become stalled during the elongation phase of transcription due to the presence of various sequence motifs [31]. Subsequently, a host of elongation factors are required to modulate the activity of RNAP. NusA, the most intensively studied elongation factor, plays a role in increasing RNAP pausing and termination [31].

The clones VR4 and VR5 encode for App different component of ABC-type transport system. The App gene browser matches them respectively on the ap0586 and the ap0950 gene. The ABC-type transport systems have been found in several bacterial species. These systems play a role in the transport of nutriments like iron and heme or antibiotics resistance. Iron and heme are essential nutrients for most pathogenic microorganisms

and play a crucial role in microbial pathogenesis [32, 33]. To survive within the iron-limited environment of the host, bacteria utilize iron-siderophore complexes, iron-binding proteins (transferrin, lactoferrin), free heme and heme bound to hemoproteins (hemoglobin, haptoglobin, hemopexin) [32]. Siderophores, hemophores and outer membrane receptors take part in iron or heme binding [34]. The transport of these ligands across the outer membrane involves outer membrane receptors [34]. The energy for this transport is delivered from the inner membrane by a TonB-ExbB-ExbD complex [35]. The transport across the cytoplasmic membrane involves periplasmic and inner membrane proteins comprising the ABC systems, which utilize the energy derived from ATP hydrolysis [36]. ATP Binding Cassette (ABC) transporters type proteins are known to be involved in the efflux of drugs in bacterial and mammalian systems [37]. Resistance to penicillin is widespread in the Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* and while several mutations are known to be implicated in resistance, other mechanisms are likely to occur [38-40]. A number of differentially expressed proteins including PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter of *S. pneumoniae* were found in *S. pneumoniae* [41].

The clone VR6 encodes for an App uncharacterized protein conserved in bacteria. The App gene browser matches the sequence on the ap0927 gene. This gene contains a sapB sequence. The prediction of the sapB protein location is the outer membrane. This protein plays a role in the epithelial cell invasion and in bacterial virulence. In *Salmonella typhimurium*, the PhoP locus encodes components of a sec-independent type III secretion apparatus [42]. The secretion apparatus and some of its targets, SapB, SapC and SspD, are necessary for epithelial cell invasion [42]. In *Salmonella*

*typhimurium*, sequence analysis of a 5.7 kb segment from the wild-type plasmid conferring resistance to protamine contained five open reading frames: sapA, sapB, sapC, sapD and sapF, organized in an operon structure [43]. The SapABCDF system constitutes a novel transporter for enteric bacteria and the first one harboring a periplasmic component with a role in virulence [43].

## 6.6 Conclusions

This report describes a simple assay for the identification of proteins that contains cleavable signal sequences. When the *Y. pseudotuberculosis* protein invasin is deleted for its amino terminus, cleavable signal sequences complement its export defect and allow it to insert into the outer membrane. Such fusions are easy to select from a genomic library via a gentamicin-sensitivity screening. Five proteins identified in this invasion screen have a predicted cleavable signal sequence. The proteins identified included a methionine synthase, a transcription elongation factor, some components of ABC transporters, and a protein involved in the epithelial cell invasion (putative virulence factor).

This approach will complement ongoing sequencing projects for several reasons. Leader peptides share little primary sequence homology [44] and are difficult to identify by automated procedures [15]. The invasin selection targets functional signals and not homology, and thus can be used to definitively assign subcellular location to the proteins encoded by uncharacterized open reading frame [15]. This invasin gene fusion method shall be a useful tool for the identification of surface exposed proteins and potential virulence factors from diverse bacterial species.

## **6.7 Methods**

### **6.7.1 Reagents and strains**

Cell culture plates were purchased from Falcon, cell culture reagents and T4 DNA ligase from NEB. Restriction enzymes were obtained from NEB, shrimp alkaline phosphatase from NEB and *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen).

### **6.7.2 Culture methods**

HeLa cells were maintained in tissue culture flasks (Falcon) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum and 1 mM sodium pyruvate. HeLa cells for the library enrichments were grown into nearly confluent monolayers in six-well tissue culture plates. HeLa cells for individual invasion assays were similarly maintained, except they were grown in 24-well plates.

### **6.7.3 Construction of pTBInv**

A 2.7 kb *inv* derivative ( $\Delta$ Inv) was designed from the pTrueBlue-rop plasmid skeleton and the pICOMII vector. A PCR of the invasin with suitable restriction sites for cloning have been done. In fact, only the truncated invasin ( $\Delta$ Inv) have been amplified.  $\Delta$ Inv lacks the first 444 nucleic acids, the sequence corresponding to the signal sequences of the wild invasin. The pTrueBlue-rop vector (Genomics one) and  $\Delta$ Inv has been cut with restriction enzymes SmaI and BglII (NEB). Ligation of the cutted pTrueBlue-rop vector and  $\Delta$ Inv with T4 DNA Ligase (NEB) to obtain the vector pTBInv.

### **6.7.4 Construction of a recombinant library in *E. coli***

App 4074 chromosomal DNA was isolated and partially digested with AluI, RsaI and SspI, and size selected from agarose gel for fragments between 300 and 700 bp with a



QIAGEN gel purification kit (Qiagen). The digested chromosomal DNA was ligated into *Sma*I-digested, dephosphorylated pTBInv. The ligation mixture was transformed into *E. Coli* DH5 $\alpha$  cells, and the resulting transformants were selected on three groups of Luria–Bertani (LB) agar plates, containing 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ampicillin (amp). The library was selected on five groups of plates and the groups enriched separately to minimize subsequent sibling isolation. As negative control, we used the DH5 $\alpha$  cells transformed with the pTBInv vector self-ligated, without any modification.

#### **6.7.5 Library enrichments/invasion assays**

The library (pTBInv/App) and the negative control (pTBInv) was removed from the selective plates, and suspended in Luria–Bertani solution (LB). Approximately  $10^7$  colony-forming units (CFU) from each of the five suspensions were used to infect HeLa cell monolayers that had been washed twice with 37°C PBS, and overlaid with 37°C DMEM without serum. The cell culture was then incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 2 h, allowing the bacteria to invade. After this incubation, the media was aspirated, and the monolayers were washed 3 times with 37°C PBS to remove extracellular bacteria. The monolayers were then incubated for another 2 h with DMEM containing 75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  gentamicin, an antibiotic that only kills extracellular bacteria. After 2 h of additional incubation, the medium was aspirated, and the monolayers were washed three times with PBS to remove any remaining extracellular bacteria. The HeLa cells were then lysed with 0.1% Triton X-100 to release intracellular bacteria. The intracellular bacteria were recovered on LB–amp-100 plates (figure 1). The survivors of the first invasion assay were pooled and used to infect HeLa cell culture again (figure 2).

### 6.7.6 Sequence analysis

The oligonucleotide 5'-AGGAGCCAGCCAATCAAGAGAG-3' (synthesized by Invitrogen) was used in determining the sequences of inserts fused to the invasin derivative in pTBIInv. This oligonucleotide recognizes the minus strand (bases 998–977) of the full length *Y. pseudotuberculosis* invasin sequence. Plasmid DNA for sequencing was isolated with Qiagen columns (Mini-prep Qiagen). DNA sequence determination was performed by the Laval University facility (Laboratoire d'analyse et de synthèse d'acides nucléiques, Pavillon Charles-Eugène Marchand) with an Applied Biosystems 377 fluorescent DNA sequencer. Sequence analysis was performed with the computer program BLASTX [45] from the National Centers for Biotechnology Information. Prediction of cleavable site of peptide signal in each of the sequences of the invasive clones was achieved with Signal IP [21]. The IBS Genome Browser for App has also been used for sequence analysis, finding location of the fragments in the genome of App, and the predicting the cellular location of the protein (<https://ibs-isb.nrc-cnrc.gc.ca/gdb>).

### 6.8 Authors' contributions

VR : AB

MS : FG

JN : MT

### 6.9 Acknowledgements

This work was supported in part by the Canadian Research Network on Swine Infectious Diseases.

## 6.10 References

1. Jacques M: **Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** *Can J Vet Res* 2004, **68**(2):81-85.
2. Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M: ***Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity.** *Anim Health Res Rev* 2000, **1**(2):73-93.
3. Bosse JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR: ***Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection.** *Microbes Infect* 2002, **4**(2):225-235.
4. Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A: **Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?** *Vet Microbiol* 2004, **100**(3-4):255-268.
5. Finlay BB, Falkow S: **Common themes in microbial pathogenicity revisited.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, **61**(2):136-169.
6. Pugsley AP: **The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria.** *Microbiol Rev* 1993, **57**(1):50-108.
7. Hoffman CS, Wright A: **Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(15):5107-5111.
8. Manoil C, Beckwith J: **Tnp<sub>phoA</sub>: a transposon probe for protein export signals.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(23):8129-8133.
9. Giladi M, Champion CI, Haake DA, Blanco DR, Miller JF, Miller JN, Lovett MA: **Use of the "blue halo" assay in the identification of genes**

- encoding exported proteins with cleavable signal peptides: cloning of a *Borrelia burgdorferi* plasmid gene with a signal peptide. *J Bacteriol* 1993, **175**(13):4129-4136.
10. Broome-Smith JK, Spratt BG: **A vector for the construction of translational fusions to TEM beta-lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology.** *Gene* 1986, **49**(3):341-349.
  11. Broome-Smith JK, Tadayyon M, Zhang Y: **Beta-lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export.** *Mol Microbiol* 1990, **4**(10):1637-1644.
  12. Calamia J, Manoil C: **Membrane protein spanning segments as export signals.** *J Mol Biol* 1992, **224**(3):539-543.
  13. Lee E, Manoil C: **Mutations eliminating the protein export function of a membrane-spanning sequence.** *J Biol Chem* 1994, **269**(46):28822-28828.
  14. Cleavinger CM, Kim MF, Im JH, Wise KS: **Identification of mycoplasma membrane proteins by systematic Tn *phoA* mutagenesis of a recombinant library.** *Mol Microbiol* 1995, **18**(2):283-293.
  15. Worley MJ, Heffron F: **Identification of exported bacterial proteins via gene fusions to *Yersinia pseudotuberculosis* invasin.** *Methods Enzymol* 2000, **326**:97-104.
  16. Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S: **Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells.** *Cell* 1987, **50**(5):769-778.

17. Isberg RR, Leong JM: **Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells.** *Cell* 1990, **60**(5):861-871.
18. Rankin S, Isberg RR, Leong JM: **The integrin-binding domain of invasin is sufficient to allow bacterial entry into mammalian cells.** *Infect Immun* 1992, **60**(9):3909-3912.
19. Wang RF, Kushner SR: **Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in Escherichia coli.** *Gene* 1991, **100**:195-199.
20. Leong JM, Fournier RS, Isberg RR: **Identification of the integrin binding domain of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein.** *Embo J* 1990, **9**(6):1979-1989.
21. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: **Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0.** *J Mol Biol* 2004, **340**(4):783-795.
22. Taurog RE, Matthews RG: **Activation of methyltetrahydrofolate by cobalamin-independent methionine synthase.** *Biochemistry* 2006, **45**(16):5092-5102.
23. Pejchal R, Ludwig ML: **Cobalamin-independent methionine synthase (MetE): a face-to-face double barrel that evolved by gene duplication.** *PLoS Biol* 2005, **3**(2):e31.
24. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L: **Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR.** *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**(11):2562-2566.

25. Vester B, Douthwaite S: **Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(1):1-12.
26. Shukla HD, Sharma SK: **Clostridium botulinum: a bug with beauty and weapon.** *Crit Rev Microbiol* 2005, **31**(1):11-18.
27. Sanz Y, Toldra F, Renault P, Poolman B: **Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of Lactococcus lactis IL1403.** *FEMS Microbiol Lett* 2003, **227**(1):33-38.
28. Harrison A, Dyer DW, Gillaspay A, Ray WC, Mungur R, Carson MB, Zhong H, Gipson J, Gipson M, Johnson LS *et al*: **Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable Haemophilus influenzae: comparative study with H. influenzae serotype d, strain KW20.** *J Bacteriol* 2005, **187**(13):4627-4636.
29. Beuth B, Pennell S, Arnvig KB, Martin SR, Taylor IA: **Structure of a Mycobacterium tuberculosis NusA-RNA complex.** *Embo J* 2005, **24**(20):3576-3587.
30. Quan S, Zhang N, French S, Squires CL: **Transcriptional polarity in rRNA operons of Escherichia coli nusA and nusB mutant strains.** *J Bacteriol* 2005, **187**(5):1632-1638.
31. Davies KM, Dedman AJ, van Horck S, Lewis PJ: **The NusA:RNA polymerase ratio is increased at sites of rRNA synthesis in Bacillus subtilis.** *Mol Microbiol* 2005, **57**(2):366-379.
32. Otto BR, Verweij-van Vught AM, MacLaren DM: **Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria.** *Crit Rev Microbiol* 1992, **18**(3):217-233.

33. Payne SM: **Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae.** *Crit Rev Microbiol* 1988, **16**(2):81-111.
34. Braun V, Braun M: **Active transport of iron and siderophore antibiotics.** *Curr Opin Microbiol* 2002, **5**(2):194-201.
35. Destoumieux-Garzon D, Duquesne S, Peduzzi J, Goulard C, Desmadril M, Letellier L, Rebuffat S, Boulanger P: **The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism.** *Biochem J* 2005, **389**(Pt 3):869-876.
36. Siudeja K, Olezak T: **[Mechanisms and regulation of iron and heme utilization in Gram-negative bacteria].** *Postepy Biochem* 2005, **51**(2):198-208.
37. Mir MA, Rajeswari HS, Veeraraghavan U, Ajitkumar P: **Molecular characterisation of ABC transporter type FtsE and FtsX proteins of Mycobacterium tuberculosis.** *Arch Microbiol* 2006, **185**(2):147-158.
38. Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, Rhomberg PR, Coffman SL, Brueggemann AB: **Antimicrobial resistance among clinical isolates of Streptococcus pneumoniae in the United States during 1999--2000, including a comparison of resistance rates since 1994--1995.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(6):1721-1729.
39. Chambers HF: **Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci.** *J Infect Dis* 1999, **179** Suppl 2:S353-359.
40. Hakenbeck R, Grebe T, Zahner D, Stock JB: **beta-lactam resistance in Streptococcus pneumoniae: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins.** *Mol Microbiol* 1999, **33**(4):673-678.

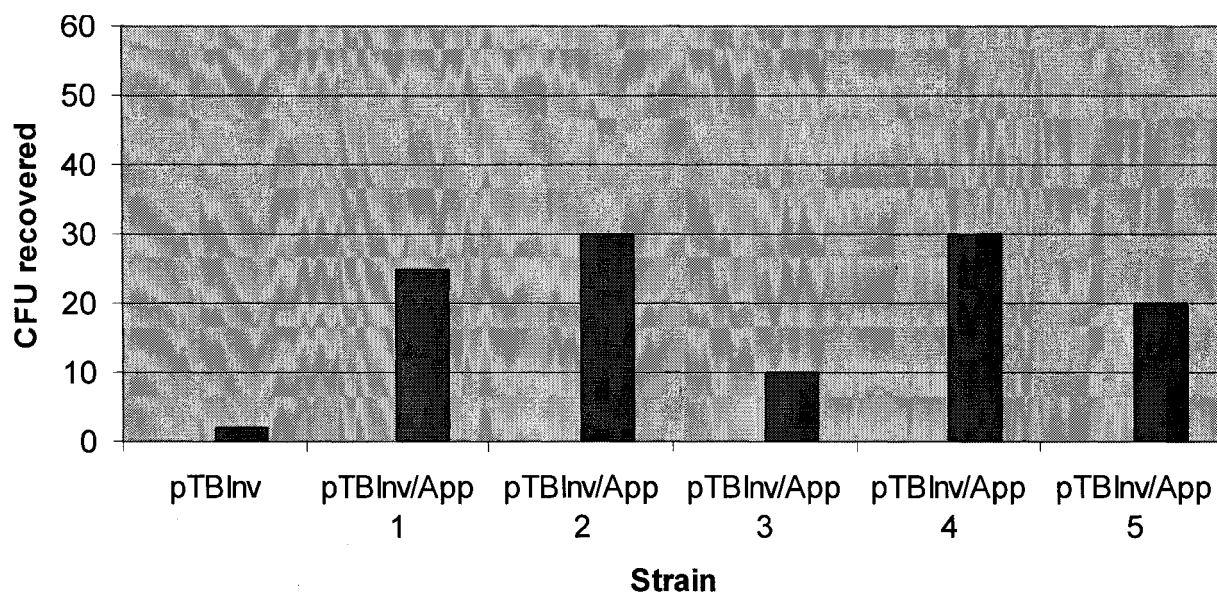
41. Soualhine H, Brochu V, Menard F, Papadopoulou B, Weiss K, Bergeron MG, Legare D, Drummelsmith J, Ouellette M: **A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter.** *Mol Microbiol* 2005, **58**(5):1430-1440.
42. Johnston C, Pegues DA, Hueck CJ, Lee A, Miller SI: **Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily.** *Mol Microbiol* 1996, **22**(4):715-727.
43. Parra-Lopez C, Baer MT, Groisman EA: **Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*.** *Embo J* 1993, **12**(11):4053-4062.
44. Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J: **Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme.** *Cell* 1997, **91**(5):563-566.
45. Altschul SF, Lipman DJ: **Protein database searches for multiple alignments.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(14):5509-5513.



## 6.11 Figures

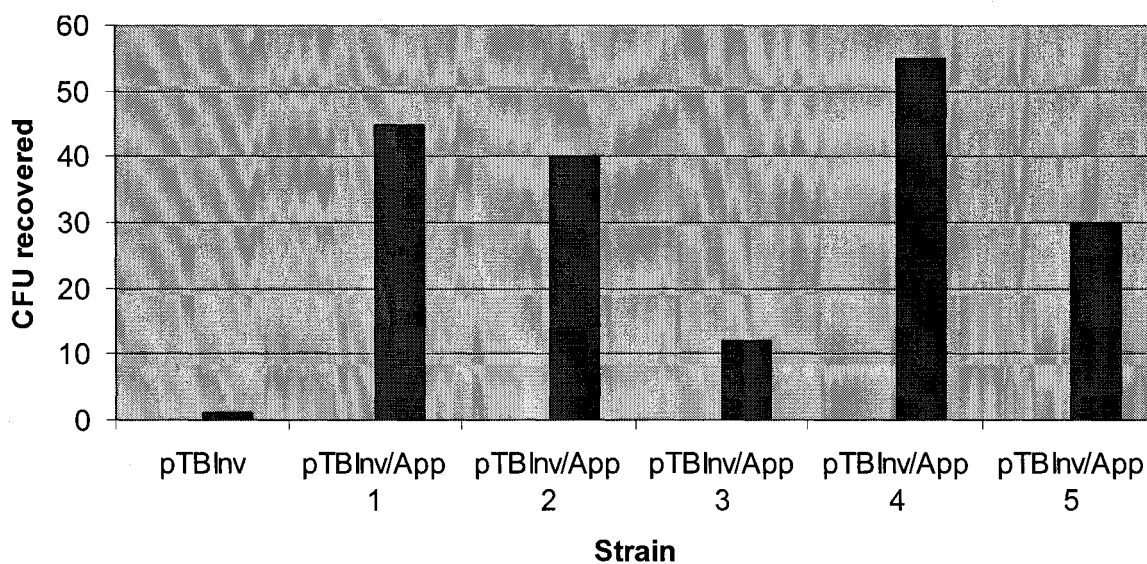
**Figure 6.1 : Colonies forming unit recovered from the first invasion assay.**

**Legend :** As negative control, self-ligated pTBInv vector was used, without any modification (strain pTBInv). The library constructed with digested App chromosomal DNA ligated into pTBInv vector was selected on five groups of plates (strain pTBInv/App 1 to 5) and the groups were enriched separately.



**Figure 6.2 : Colonies forming unit recovered from the second invasion assay.**

**Legend :** Same as figure 1.



## 6.12 Table

**Table 6.1 : Genes identified and deduced sequence of proteins that promoted  $\Delta$ Inv export. Legend : The first five isolates analysed contain putative cleavable signal sequences with the proposed cleavage site in bold face.**

<p><b>VR1</b> : <i>A. pleuropneumoniae</i> methionine synthase II (cobalamin-independent)</p> <p>MITMSKLF<b>PNAT</b>QRTSAPYRFDIVGSFLRTDPIKQ</p>
<p><b>VR2</b> : <i>A. pleuropneumoniae</i> ABC-type multidrug transport system, permease component</p> <p>MLRWFKNVAFLSAKEFKSLFSDKVLVAMIYMF<b>SAAIL</b>TIKQGMTDVKNGSVAIVDYDHSTLSYRLQ</p> <p>DALIPPYFKTVEEVKTDQVEYLMDNKGKFTFVVEIPANFQRDLSSGKSPHLQLLVDATAMTQANIGSS</p> <p>YITQIFNREIQQFLGISALQ</p>
<p><b>VR3</b> : <i>H. ducreyi</i> transcription termination-antitermination factor nusA homologue (87% of identity)</p> <p>MPFSAS<b>LNAI</b>WRSKPSKFNKRSSICACFNASSSANAFAVIAFFARVCNSSARFSSSIPSIIVNSLTG</p> <p>MNAISSK</p>
<p><b>VR4</b> : <i>A. pleuropneumoniae</i> ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component.</p> <p>MKLIKFAFLCFIAFLSAQ<b>VAAH</b>PHSFLDLKNKILVEGTNLKGFQMEWTMDEIASAE</p>
<p><b>VR5</b> : <i>A. pleuropneumoniae</i> ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component.</p> <p>NGGARFRALSTSSKIALIFILFVACVAILAPIV<b>APYD</b>PLQTLRPVQAPSGDYLFGTDRDLGRDIFSRMV</p> <p>WGARTSLFIGLGAVGVAILFGGILGATAATADKFGNEVIMRLMDILMAFFGIALAAVLLATFGNSVPVI</p> <p>IITIAVVYTPQLARVVRANVVSQWEEDYVRAERVLGGSRTYILLKHVVRNTAAPVLVFATVMVADAIV</p> <p>FE</p>
<p><b>VR6</b> : <i>A. pleuropneumoniae</i> uncharacterized protein conserved in bacteria.</p> <p>RQGKQGLGLYGQVNLKNGRYSSFGQDLLIRKGVISFAGLPSQPSLNIEAIRNPEAMEDPSITAGVKV</p> <p>IGLADSPEVKVFSEPAMSQNEALSHVLTGRSLDNSGDAGSSNSMAAALISMSLSKSSKTVGAVGS</p>

## CHAPITRE VII

### DISCUSSION

#### 7.1 Synthèse et interprétation des résultats

L'article scientifique présenté à la section précédente décrit une méthode d'identification de protéines contenant un peptide signal clivable. La méthode utilise la protéine invasine de *Y. pseudotuberculosis* permettant à cette souche d'envahir les cellules hôtes eucaryotes. L'invasine est tronquée au niveau de sa partie amine terminale, c'est-à-dire de son peptide signal, ce qui empêche le phénotype d'invasion. Nous avons été en mesure de fusionner des séquences d'ADN génomique d'App à la séquence de l'invasine tronquée permettant de conférer le phénotype d'invasion à une souche d'*E.coli*. Les plasmides des colonies invasives isolées ont ensuite été purifiés. Cette méthode a permis l'identification de cinq protéines possédant une séquence de peptide signal clivable tel que prédite par le logiciel SignalP. La première protéine est une méthionine synthase. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme de la vitamine B12 chez plusieurs espèces bactériennes. Différentes composantes de transporteurs de type ABC ont également été isolés. Ces derniers sont retrouvés chez plusieurs espèces bactériennes et sont impliqués dans différents types de transport de nutriments comme l'hème et le fer et dans la résistance à certains antibiotiques. Une des protéines isolées est un facteur d'élongation de transcription. Cette protéine NusA est le facteur d'élongation bactérien le plus étudié car il est en étroite relation avec l'ARN polymérase bactérienne. Une protéine impliquée dans l'invasion de cellules épithéliales ou dans la virulence bactérienne a également été isolée. Cette protéine ne contient cependant pas de prédiction de peptide signal.

Sur un total de 41 plasmides séquencés, il y a 22 protéines isolées à partir de clones invasifs qui ne comportent pas de prédiction de peptide signal. Ces protéines peuvent posséder un peptide signal autre que ceux impliqués dans le «General Secretory Pathway», ces derniers ne pouvant pas être identifiés par les méthodes utilisées. Ils peuvent également être des faux positifs. Des analyses plus poussées pour répondre à

ces interrogations devront être effectuées par les individus qui poursuivront mes travaux de recherche.

## **7.2 Limites de la technique**

Certains clones obtenus se sont avérés être des doublons. Il s'agit d'un phénomène tout à fait normal puisque la banque générée dans le vecteur pTBInv peut contenir plusieurs copies d'un même fragment, étant donné le biais lié à la fragmentation de l'ADN d'App par des enzymes de restriction. En effet, la digestion d'ADN génomique par enzyme de restriction n'offre pas un fractionnement aléatoire puisque qu'une enzyme reconnaît une séquence précise de nucléotides. Certaines parties de l'ADN qui ne possèdent pas la séquence de nucléotides reconnus par l'enzyme de restriction ne sont donc pas fractionnées et par conséquent presque impossible à cloner. Une alternative à l'utilisation des enzymes de restriction serait une technique de fractionnement plus aléatoire et plus complète de l'ADN ; la nébulisation. Cette méthode consiste à fragmenter aléatoirement l'ADN en forçant son passage dans un petit orifice par application d'une pression gazeuse. On procède ensuite à la réparation des fragments d'ADN afin d'obtenir des extrémités franches. Il faudrait également apporter des modifications au vecteur pTBInv original afin que ces fragments d'ADN à extrémités franches soient en mesure d'y être clonés.

## **7.3 Importance prévue des travaux**

Les retombées de ce projet de recherche sont nombreuses. L'approche d'isolement de peptide signal fusionné avec l'invasine pourrait aider à compléter les projets de séquençages de génomes bactériens déjà en cours. Les peptides signaux partagent peu d'homologie de séquence au niveau de leur ADN (93) et sont donc difficilement identifiables par des procédures automatisées. Cette technologie pourrait également être utilisée pour l'isolement de peptides signaux retrouvés chez d'autres types de souches bactériennes. Il s'agit simplement de remplacer l'ADN d'App par celui d'une autre espèce bactérienne dans le vecteur contenant l'invasine tronquée.

L'identification et la caractérisation des protéines membranaires sont souvent à la base de l'élaboration des vaccins (84). Une protéine antigénique susceptible de faire partie de la composition d'un nouveau vaccin doit être exposée à la surface de la bactérie et stimuler le système immunitaire de l'hôte, c'est-à-dire être reconnue par les anticorps et devenir la cible des cellules phagocytaires telles les macrophages. Une meilleure identification de l'expression des protéines de surface pourrait nous permettre d'envisager le développement de vaccins. En effet, les vaccins présentement disponibles pour protéger les élevages de porcs contre la pleuropneumonie ne sont pas complètement efficaces (35). Des données sur les facteurs de virulence méconnus, comme par exemple les protéines de membrane externe, seraient grandement utiles à la conception de vaccins plus efficaces.

#### **7.4 Perspective de recherche**

Il faut tout d'abord mentionner que les analyses réalisées pourraient être beaucoup plus détaillées dans un futur rapproché étant donné l'avancement rapide des données génomiques bactériennes disponibles dans les nombreuses banques de données publiques. Les résultats d'analyses seront de plus en plus précis, en étroite relation avec la disponibilité des séquences bactériennes dans les banques de données. D'autres essais d'invasion dans le but d'isoler un plus grand nombre de séquences seraient pertinents à réaliser. Il faut poursuivre la recherche et les analyses de clones invasifs obtenus par cette méthode dans le but de constituer la banque la plus complète possible de séquences d'ADN correspondant à des peptides signaux d'OMPs.

Les peptides signaux identifiés devront être comparés avec les banques de séquences d'ADN connues à ce jour. Cela permettra de faire lien entre la séquence du peptide signal et le cadre ouvert de lecture de la protéine en aval de cette séquence de peptide signal. Des déductions d'identification des OMPs d'App pourront alors être effectuées. Des vérifications d'exportation de ces protéines et de leur présence à la surface d'App devront ensuite être réalisées. Des tests immunologiques *in vivo* pourront s'en suivre dans le but de déterminer le caractère immunologique de ces protéines et leur

importance dans la virulence d'App. Par exemple, les différents clones exprimant les protéines immunologiques potentielles pourraient être testés par un immunobuvardage avec un sérum de porcs convalescent à la pleuropneumonie porcine.

Plusieurs avenues de recherche sont envisagées pour faire suite aux résultats obtenus dans cette étude. Tout d'abord, les protéines potentiellement antigéniques pourraient être sujettes à une expression des gènes qui y sont associés. Une fois les protéines obtenues, la production d'anticorps chez le porc pourrait être effectuée. Ces anticorps pourront être testés sur des lysats de culture d'App obtenus lors de culture dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. On sera alors en mesure de différencier les protéines produites en conditions *in vivo* seulement, ce qui fournirait un outil puissant pour la production de vaccin et des informations supplémentaires quand au mode d'infection d'App et ses mécanismes d'expression de protéines immunogènes. Les anticorps pourraient également servir à établir si les protéines sont des antigènes protecteurs, c'est-à-dire des protéines pouvant servir dans la fabrication de vaccins.

De plus, il serait intéressant d'effectuer une vérification de la réponse immunogène de sérums d'animaux convalescents face à ces protéines. Si les porcs ont développé des anticorps face à certaines protéines lors de leur infection à la pleuropneumonie, il est fort possible que ces protéines soient immunogènes et donc d'intérêt pour l'élaboration de vaccin. Les résultats positifs devront cependant être évalués avec beaucoup de précautions. En effet, les protéines reconnues par les anticorps ne sont pas nécessairement des protéines qui stimulent le système immunitaire du porc lors du processus infectieux. En d'autres mots, lors d'une infection bactérienne chez le porc (également chez les autres espèces) un grand nombre de bactéries meurent libérant ainsi les protéines cytoplasmiques. Ces dernières peuvent être reconnus comme protéines étrangères et stimuler la production de nouveaux anticorps.

Une autre avenue de recherche intéressante serait d'inactiver les gènes codant pour les protéines d'intérêts chez App pour faire en sorte d'empêcher l'expression et la

production de la protéine. Une fois la souche mutante obtenue, il s'agira de vérifier si la virulence de la bactérie est modifiée (par des tests en conditions *in vivo*) et le cas échéant, considérer la production de vaccin vivant atténué. L'objectif terminal de tout cela sera d'élucider les mécanismes d'expression et de régulation géniques de la virulence d'App.

### **7.5 Alternative de détection de l'invasine par un procédé original immuno-magnétique**

Ce procédé alternatif d'isolation de séquences permettant l'exportation de l'invasine tronquée pourrait être un excellent complément à la technique d'isolation utilisant les cellules HeLa. Il s'agit de continuer le projet et de compléter les étapes qui sont déjà réalisées. Pour ma part, je passe le flambeau. Voici la description de la technique, avis aux intéressé(e)s !

Plusieurs expérimentations d'invasion avec des souches d'*E. coli* ont été effectuées dans le passé. Généralement, les techniques utilisaient des cellules hôtes de type HeLa pour effectuer la sélection des bactéries invasives (81). Puisque l'invasion *in vitro* est relativement complexe et longue à réaliser (plusieurs passages), une approche différente de détection de l'invasine a été envisagée. Cette technique utilise également le vecteur pTBIInv mais la détection des clones exprimant l'invasine s'effectue d'une façon différente. La méthode se base sur la reconnaissance de l'expression de l'invasine à l'aide d'un anticorps primaire et l'isolation des bactéries exprimant cette protéine à leur surface s'effectuera par la suite à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des billes magnétiques. La méthode des billes magnétiques couplées à des anticorps est une approche très sensible d'isolation et la séparation immuno-magnétique permettent l'isolement des bactéries ciblées à partir d'une suspension très hétérogène (94). Cette méthode est beaucoup plus simple, rapide et sensible que la méthode d'invasion de cellules eucaryotes. De plus, le procédé pourrait être reproductible pour rechercher des gènes d'exportation de protéines chez d'autres souches bactériennes.

Plusieurs étapes de cette méthode alternative de détection de l'invasine ont déjà été réalisées. Les premières étapes ont été le clonage, l'expression et la purification de l'invasine tronquée. Ensuite, des anticorps anti-invasine ont été produits chez le lapin et une adsorption de ces anticorps a également été effectuée. L'étape finale du procédé reste cependant à être effectuée. Il s'agit de la détection de l'expression de l'invasine par anticorps.

### **7.5.1 Clonage, expression et purification de l'invasine tronquée**

Une réaction de polymérisation en chaîne a été effectuée afin d'amplifier la partie de l'invasine exposée à la surface bactérienne de *Yersinia pseudotuberculosis*. Cette invasine tronquée se retrouve sans sa séquence d'exportation (peptide signal) et sa partie transmembranaire. Les vecteurs pDrive (PCR cloning kit, Qiagen) et pQE30-UA (Qiaexpress kit, Qiagen) ont été utilisés pour le clonage. Le vecteur pQE30-UA ajoute une séquence de 6 histidines (His<sub>6</sub>-marqué) en amont de la protéine clonée lors de son expression. Cela permet de purifier l'invasine parmi toutes les autres protéines retrouvées chez la souche bactérienne grâce aux ions de nickel (Ni) retrouvés sur la résine NTA de la colonne de purification. La souche d'*E. coli* M15 recombinante a été choisie pour l'expression et la purification de la protéine invasine His<sub>6</sub>-tagged (Qiaexpress kit, Qiagen). La purification de la protéine invasine tronquée a été effectuée par FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) avec résine Ni-NTA en conditions dénaturantes.

### **7.5.2 Production d'anticorps anti-invasine chez le lapin**

La purification FPLC en conditions dénaturantes n'a pas permis d'obtenir une pureté protéique satisfaisante. L'élution de la purification d'invasine a donc été séparée sur gel de type SDS-PAGE afin de séparer les différentes protéines présentes. La bande correspondante à l'invasine tronquée (90 kDa) a été découpée directement sur un gel de polyacrylamide. La bande de gel contenant l'invasine fut ensuite utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux chez le lapin tel que suggéré par Amero *et al.* (95). Deux lapins New-Zealand ont été immunisés pendant 5 semaines en raison de 2 injections intra-musculaires par semaine. Les injections étaient constituées de 500 µl de



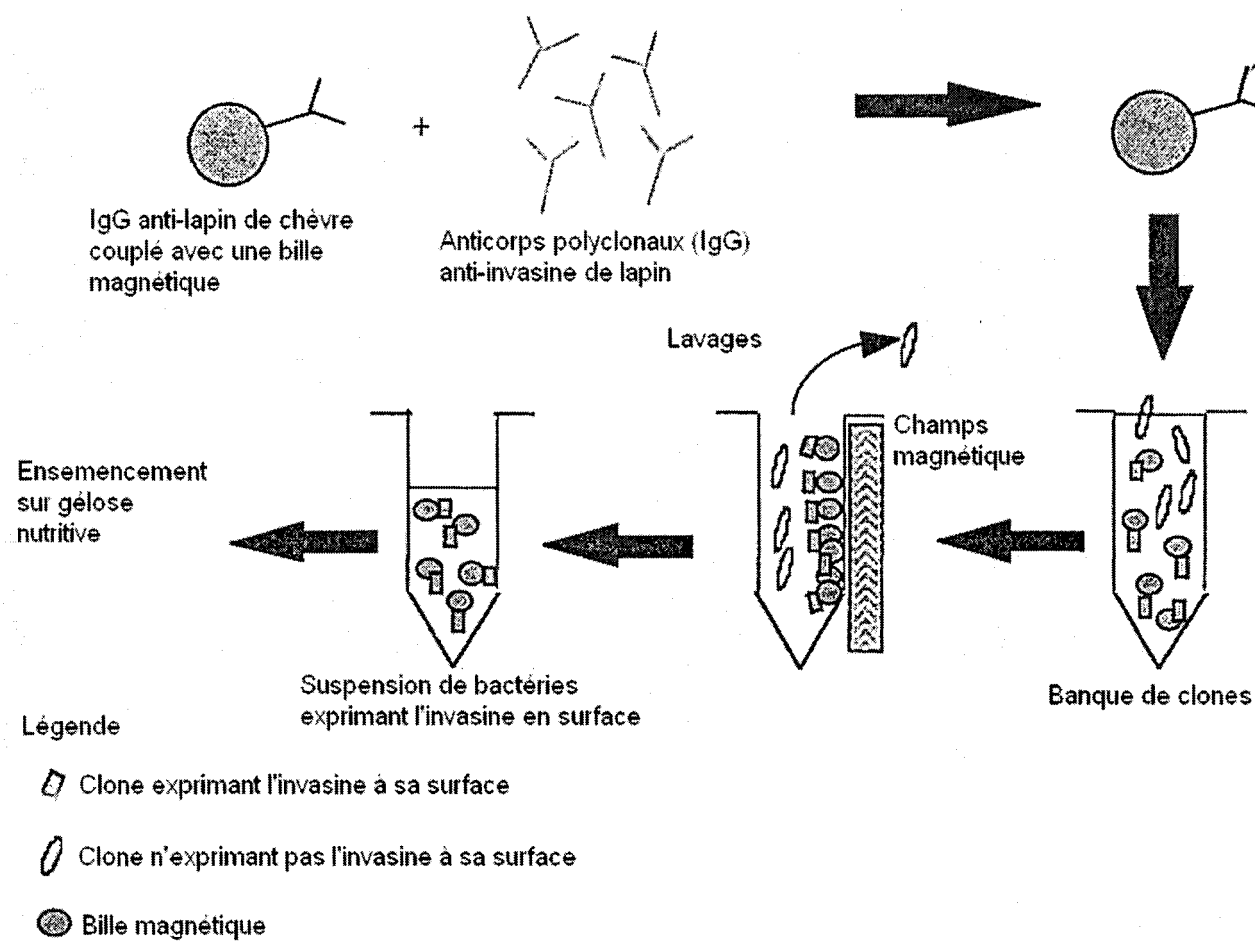
préparation d'invasine (environ 0,5 mg de protéine) avec 500 µl d'adjuvant incomplet de Freund. Les lapins ont ensuite été sacrifiés et leur sérum (antisérum) a été récupéré.

### **7.5.3 Adsorption des anticorps secondaires**

Les anticorps polyclonaux produits à partir de l'invasine tronquée purifiée ont été mis en contact avec une culture bactérienne de *E. coli* DH5α afin d'éliminer le plus possible les anticorps non-spécifiques à l'invasine. L'adsorption des anticorps a été effectuée avec la souche de *E. coli* DH5α dans laquelle la banque de clones sera réalisée. Les anticorps non-spécifiques se liant à des protéines de surface de *E. coli*, sont alors éliminés du surnageant de la culture. L'utilisation des anticorps du surnageant lors de l'isolation immuno-magnétique a pour but d'éliminer les réactions anticorps-antigènes non spécifiques à l'invasine.

### **7.5.4 Détection de l'expression de l'invasine par anticorps**

Pour la suite du procédé, un couplage des anti-invasine provenant du lapin (anticorps primaire) avec des anticorps anti-lapins contenant une bille magnétique produits chez la chèvre (anticorps secondaires M-280 de Dynal Biotech) doit être effectué. Les anticorps de chèvre reconnaissant ceux du lapin, résultant en un complexe anti-invasine immuno-magnétique. Finalement, un criblage de la banque de clones contenant le vecteur pTBIInv ligés avec des fragments d'ADN d'App devra être effectué avec les anti-invasine immuno-magnétiques. La banque de clones sera cultivée dans un milieu Luria-Bertani (LB) contenant 100 µg/ml d'ampicilline avant le criblage. La procédure est résumée à la FIGURE 7.1.



**FIGURE 7.1 :** Principe de la méthode de sélection immuno-magnétique de bactéries invasives.

## CHAPITRE VIII

### CONCLUSION

Les travaux décrits dans ce présent document se concentrent sur l'identification de protéines de membrane externe qui, de par leur localisation à la surface bactérienne, sont en contact direct avec l'environnement immédiat de la bactérie c'est-à-dire avec son hôte. Les protéines de membrane externe sont donc une cible potentielle pour les anticorps produits par le système immunitaire de l'hôte. Une meilleure identification de ces protéines immunogènes pourrait permettre la mise au point de nouveaux vaccins efficaces contre la pleuropneumonie porcine.

L'article scientifique présent dans ce mémoire décrit une méthode d'identification de protéines contenant un peptide signal clivable. La méthode utilise la protéine invasine de *Y. pseudotuberculosis* qui permet à cette espèce bactérienne d'envahir les cellules hôtes eucaryotes. L'invasine est tronquée de sa partie amine terminale c'est-à-dire son peptide signal ce qui empêche l'exportation de la protéine à la surface bactérienne et inhibe par le fait même le phénotype d'invasion. Nous avons été en mesure de fusionner des séquences d'ADN génomique d'App à la séquence de l'invasine tronquée permettant de conférer un nouveau phénotype d'invasion à une souche d'*E.coli*.

Une banque de fragments d'ADN d'App a été créée dans le vecteur pTBInv. Après transformation dans la souche *E. coli* DH5 $\alpha$ , une sélection des divers clones par phénotype d'invasion de cellules HeLa a été effectuée. 300 clones invasifs ont ainsi été sélectionnés et des analyses des séquences d'ADN d'App clonés ont ensuite été réalisées. Parmi ces clones, 41 ont été séquencés et ont été comparés avec les séquences génomiques d'App des banques de données. Après comparaison, plusieurs clones ont montré une homologie avec des lipoprotéines, des protéines de la membrane externe et des transporteurs chez App et chez d'autres espèces bactériennes. De plus, 5 clones comportent une séquence de peptide signal prédite pour le logiciel SignalP.

Les autres séquences des clones positifs obtenus devront être analysées afin d'obtenir un profil plus complet des résultats. Dans l'avenir, il serait également très avantageux d'utiliser la méthode d'isolation immuno-magnétique afin d'isoler d'autres clones invasifs. Les gènes complets de clones positifs devront également être isolés à partir d'une banque génomique d'App et leur potentiel immunologique devra par la suite être évalué. Ensuite, il sera intéressant d'éclaircir le rôle que ces protéines peuvent avoir chez App, et surtout de déterminer s'elles sont importantes pour la virulence de la bactérie. Cela pourrait permettre d'effectuer des percées importantes pour l'élucidation des mécanismes de virulence d'App et pour l'élaboration d'un vaccin efficace pour la prévention contre la pleuropneumonie porcine.

Finalement, notre approche de mise en évidence de peptide signal fusionné avec l'invasine pourrait aider à compléter les projets de séquençages de génomes bactériens déjà en cours. Les peptides signaux partagent peu d'homologie de séquence au niveau de leur ADN (93) et sont donc difficilement identifiables par des procédures de séquençages et de bioinformatiques automatisées. Notre technologie pourrait également être utilisée pour l'isolement de peptides signaux retrouvés chez d'autres types de souches bactériennes.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BOSSE, J. T., JANSON, H., SHEEHAN, B. J., BEDDEK A.J., RYCROFT, A. N., KROLL, J. S. & LANGFORD, P. R. (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection, *Microbes Infect*, 4, 225-35.
2. DOM, P., HAESEBROUCK, F., DUCATELLE, R. & CHARLIER, G. (1994) In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs, *Infect Immun*, 62, 1262-7.
3. SIDIBE, M., MESSIER, S., LARIVIERE, S., GOTTSCHALK, M. & MITTAL, K. R. (1993) Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests, *Can J Vet Res*, 57, 204-8.
4. DUFF, J. P., SCOTT, W. A., WILKES, M. K. & HUNT, B. (1996) Otitis in a weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*, *Vet Rec*, 139, 561-3.
5. LECHTENBERG, K. F., SHRYOCK, T. R. & MOORE, G. (1994) Characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* seeder pig challenge-exposure model, *Am J Vet Res*, 55, 1703-9.
6. TORREMORELL, M., PIJOAN, C., JANNI, K., WALKER, R. & JOO, H. S. (1997) Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs, *Am J Vet Res*, 58, 828-32.
7. JOBERT, J. L., SAVOYE, C., CARIOLET, R., KOBISCH, M. & MADEC, F. (2000) Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs, *Can J Vet Res*, 64, 21-6.
8. PATTISON, I. H., HOWELL, D. G. & ELLIOT, J. (1957) A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions, *J Comp Pathol*, 67, 320-30.
9. KIELSTEIN, P. (1981) [Bacteriological diagnosis of *Haemophilus pleuropneumonia* in swine], *Arch Exp Veterinarmed*, 35, 389-400.
10. MUTTERS, R., BISGAARD, M. & POHL, S. (1986) Taxonomic relationship of selected biogroups of *Pasteurella haemolytica* as revealed by DNA:DNA hybridizations, *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]*, 94, 195-202.

11. O'REILLY, T. & NIVEN, D. F. (2003) Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*, *Can J Vet Res*, 67, 229-31.
12. SCHALLER, A., DJORDJEVIC, S. P., EAMENS, G. J., FORBES, W.A. KUHN, R. KUHNERT, P, GOTTSCHALK, M., NICOLET, J. & FREY, J. (2001) Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*, *Vet Microbiol*, 79, 47-62.
13. BEYNON, L. M., GRIFFITH, D. W., RICHARDS, J. C. & PERRY, M. B. (1992) Characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 9 and 11: antigenic relationships among serotypes 9, 11, and 1, *J Bacteriol*, 174, 5324-31.
14. FREY, J. (1995) Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins, *Trends Microbiol*, 3, 257-61.
15. ROGERS, R. J., EAVES, L. E., BLACKALL, P. J. & TRUMAN, K. F. (1990) The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*, *Aust Vet J*, 67, 9-12.
16. JACQUES, M., FOIRY, B., HIGGINS, R. & MITTAL, K. R. (1988) Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *J Bacteriol*, 170, 3314-8.
17. ROSENDAL, S. & MACINNES, J. I. (1990) Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1, *Am J Vet Res*, 51, 711-7.
18. CRUIJSEN, T., VAN LEENGOED, L. A., HAM-HOFFIES, M. & VERHEIJDEN, J. H. (1995) Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain, *Infect Immun*, 63, 2341-3.
19. LIGGETT, A. D., HARRISON, L. R. & FARRELL, R. L. (1987) Sequential study of lesion development in experimental *haemophilus pleuropneumonia*, *Res Vet Sci*, 42, 204-12.
20. FINLAY, B. B. & FALKOW, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited, *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 136-69.
21. KAPLAN, J. B., VELLIYAGOUNDER, K., RAGUNATH, C., ROHDE H. & MACK, D. (2004) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms, *J Bacteriol*, 186, 8213-20.

22. ENRIQUEZ-VERDUGO, I., GUERRERO, A. L., SERRANO, J. J. & GODINEZ, D. (2004) Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen, *Microbiology*, 150, 2391-400.
23. VAN OVERBEKE, I., CHIERS, K., CHARLIER, G., VAN BEEUMEN, J., DUCATELLE, R. & HAESBROUCK, F. (2002) Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells, *Vet Microbiol*, 88, 59-74.
24. KROGFELT, K. A. (1991) Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*, *Rev Infect Dis*, 13, 721-35.
25. MACFADYEN, L. P. & REDFIELD, R. J. (1996) Life in mucus: sugar metabolism in *Haemophilus influenzae*, *Res Microbiol*, 147, 541-51.
26. LANGFORD, P. R., LOYNDS, B. M. & KROLL, J. S. (1996) Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Infect Immun*, 64, 5035-41.
27. FULLER, T. E., MARTIN, S., TEEL, J. F., ALANIZ, G. R. & KENNEDY, M. J. (2000) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model, *Microb Pathog*, 29, 39-51.
28. BOSSE, J. T. & MACINNES, J. I. (2000) Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection, *Can J Vet Res*, 64, 145-50.
29. FREY, J., BOSSE, J. T., CHANG, Y. F., CULLEN, J. M., FENWICK, B., GERLACH, G. F., GYGI, D., HAESBROUCK, F., INZANA, T. J. & JANSEN, R. (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes, *J Gen Microbiol*, 139, 1723-8.
30. SHEEHAN, B. J., BOSSE, J. T., BEDDEK, A. J., RYCROFT, A. N. & KROLL, J. S. (2003) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host, *Infect Immun*, 71, 3960-70.
31. HAESBROUCK, F., VAN DE KERKHOF, A., DOM, P., CHIERS, K. & DUCATELLE, R. (1996) Cross-protection between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs, *Vet Microbiol*, 52, 277-84.

32. CHIERS, K., VAN OVERBEKE, I., DE LAENDER, P., DUCATELLE, R. & HAESBROUCK, F. (1998) Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins, *Vet Q*, 20, 65-9.
33. FURESZ, S. E., MALLARD, B. A., BOSSE, J. T., ROSENDAL, S. (1997) Antibody- and cell-mediated immune responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs, *Infect Immun*, 65, 358-65.
34. JACQUES, M. (2004) Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Can J Vet Res*, 68, 81-5.
35. HAESBROUCK, F., PASMANS, F., CHIERS, K., MAES, D. & DUCATELLE, R. (2004) Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol*, 100, 255-68.
36. SCHALLER, A., KUHN, R., KUHNERT, P. & NICOLET, J. (1999) Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Microbiology*, 145 (Pt 8), 2105-16.
37. WELCH, R. A., BAUER, M. E., KENT, A. D., LEEDS, J. A. & MOAYERI, M. (1995) Battling against host phagocytes: the wherefore of the RTX family of toxins? *Infect Agents Dis*, 4, 254-72.
38. JARMA, E., CORRADINO, G. & REGASSA, L. B. (2004) Anaerobiosis, growth phase and *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin production, *Microb Pathog*, 37, 29-33.
39. JARMA, E. & REGASSA, L. B. (2004) Growth phase mediated regulation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI and ApxII toxins, *Microb Pathog*, 36, 197-203.
40. JANSSEN, R., BRIARE, J., SMITH, H. E., DOM, P. & HAESBROUCK, F. (1995) Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils, *Infect Immun*, 63, 27-37.
41. OGIKUBO, Y., NORIMATSU, M., KOJIMA, A., SASAKI, Y. & TAMURA, Y. (1999) Biological activities of lipopolysaccharides extracted from porcine vaccine strains, *J Vet Med Sci*, 61, 1265-9.



42. PARADIS, S. E., DUBREUIL, D., RIOUX, S., GOTTSCHALK, M. & JACQUES, M. (1994) High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells, *Infect Immun*, 62, 3311-9.
43. FENWICK, B. W. & OSBURN, B. I. (1986) Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs, *Infect Immun*, 54, 575-82.
44. FENWICK, B. W., OSBURN, B. I. & OLANDER, H. J. (1986) Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Am J Vet Res*, 47, 1433-41.
45. INZANA, T. J., MA, J., WORKMAN, T., GOGOLEWSKI, R. P. & ANDERSON, P. (1988) Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5, *Infect Immun*, 56, 1880-9.
46. WARD, C. K. & INZANA, T. J. (1994) Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide, *J Immunol*, 153, 2110-21.
47. BOEKEMA, B. K., VAN PUTTEN, J. P., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N. & SMITH, H. E. (2004) Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Infect Immun*, 72, 691-700.
48. HULTGREN, S. J., ABRAHAM, S., CAPARON, M. & FALK, P. (1993) Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition, *Cell*, 73, 887-901.
49. SAUER, F. G., MULVEY, M. A., SCHILLING, J. D., MARTINEZ, J. J. & HULTGREN, S. J. (2000) Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis, *Curr Opin Microbiol*, 3, 65-72.
50. PAYNE, S. M. (1993) Iron acquisition in microbial pathogenesis, *Trends Microbiol*, 1, 66-9.
51. PINTOR, M., FERREIROS, C. M. & CRIADO, M. T. (1993) Characterization of the transferrin-iron uptake system in *Neisseria meningitidis*, *FEMS Microbiol Lett*, 112, 159-65.

52. CORNELISSEN, C. N. & SPARLING, P. F. (1994) Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens, *Mol Microbiol*, 14, 843-50.
53. SCHRYVERS, A. B. & GONZALEZ, G. C. (1989) Comparison of the abilities of different protein sources of iron to enhance *Neisseria meningitidis* infection in mice, *Infect Immun*, 57, 2425-9.
54. SCHRYVERS, A. B. & GRAY-OWEN, S. (1992) Iron acquisition in *Haemophilus influenzae*: receptors for human transferrin, *J Infect Dis*, 165 Suppl 1, S103-4.
55. BELANGER, M., BEGIN, C. & JACQUES, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin, *Infect Immun*, 63, 656-62.
56. ARCHAMBAULT, M., RIOUX, S. & JACQUES, M. (1999) Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry, *FEMS Microbiol Lett*, 173, 17-25.
57. TASCÓN, R. I., VAZQUEZ-BOLAND, J. A., GUTIERREZ-MARTIN, C. B., RODRIGUEZ-BARBOSA, J. I. & RODRIGUEZ-FERRI, E. F. (1996) Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Microbiologia*, 12, 171-84.
58. SHEEHAN, B. J., LANGFORD, P. R., RYCROFT, A. N. & KROLL, J. S. (2000) [Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host, *Infect Immun*, 68, 4778-81.
59. PUGSLEY, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria, *Microbiol Rev*, 57, 50-108.
60. GOMEZ, M., JOHNSON, S. & GENNARO, M. L. (2000) Identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a bioinformatic approach, *Infect Immun*, 68, 2323-7.
61. VON HEIJNE, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule, *J Mol Biol*, 225, 487-94.
62. TJALSMA, H., ANTELMANN, H., JONGBLOED, J. D., BRAUN, P. G., DARMON, E., DUBOIS, J. Y., WESTERS, H., ZANEN, G., QUAX, W. J., KUIPERS, O. P., BRON, S., HECKER, M. & VAN DIJL, J. M. (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the 'secrets' of the secretome, *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 207-33.

63. BINA, J. E., NANO, F. & HANCOCK, R. E. (1997) Utilization of alkaline phosphatase fusions to identify secreted proteins, including potential efflux proteins and virulence factors from *Helicobacter pylori*, *FEMS Microbiol Lett*, 148, 63-8.
64. MINTZ, K. P. & FIVES-TAYLOR, P. M. (1999) Identification of genes coding for exported proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infect Immun*, 67, 6217-20.
65. WILLIAMS, R. J., WARD, J. M., HENDERSON, B., WILSON, M. & NAIR, S. P. (2000) Rapid screening for putative exported proteins from *Staphylococcus aureus* using alkaline phosphatase as a reporter molecule, *Mol Biotechnol*, 15, 11-20.
66. NESMEYANOVA, M. A. (2000) Polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*, *Biochemistry (Mosc)*, 65, 309-14.
67. NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. & VON HEIJNE, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng*, 10, 1-6.
68. NIELSEN, H. & KROGH, A. (1998) Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model, *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 6, 122-30.
69. MENNE, K. M., HERMJAKOB, H. & APWEILER, R. (2000) A comparison of signal sequence prediction methods using a test set of signal peptides, *Bioinformatics*, 16, 741-2.
70. BENDTSEN, J. D., NIELSEN, H., VON HEIJNE, G. & BRUNAK, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *J Mol Biol*, 340, 783-95.
71. JONGBLOED, J. D., MARTIN, U., ANTELMANN, H., HECKER, M. TJALSMA, H., VENEMA, G., BRON, S., VAN DIJL, J. M. & MULLER, J. (2000) TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway, *J Biol Chem*, 275, 41350-7.
72. TJALSMA, H., BOLHUIS, A., JONGBLOED, J. D., BRON, S. & VAN DIJL, J. M. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome, *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 515-47.
73. WORLEY, M. J. & HEFFRON, F. (2000) Identification of exported bacterial proteins via gene fusions to *Yersinia pseudotuberculosis* invasin, *Methods Enzymol*, 326, 97-104.

74. WANG, R. F. & KUSHNER, S. R. (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*, *Gene*, 100, 195-9.
75. FALKOW, S., ISBERG, R. R. & PORTNOY, D. A. (1992) The interaction of bacteria with mammalian cells, *Annu Rev Cell Biol*, 8, 333-63.
76. ISBERG, R. R., VOORHIS, D. L. & FALKOW, S. (1987) Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells, *Cell*, 50, 769-78.
77. ISBERG, R. R. & VAN NHIEU, G. T. (1995) The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction, *Trends Cell Biol*, 5, 120-4.
78. ISBERG, R. R. & LEONG, J. M. (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells, *Cell*, 60, 861-71.
79. FINLAY, B. B. & FALKOW, S. (1988) Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication, *Biochimie*, 70, 1089-99.
80. YOUNG, V. B., FALKOW, S. & SCHOOLNIK, G. K. (1992) The invasin protein of *Yersinia enterocolitica*: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton, *J Cell Biol*, 116, 197-207.
81. JOUVE, M., GARCIA, M. I., COURCOUX, P., LABIGNE, A. & GOUNON, P. (1997) Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively, *Infect Immun*, 65, 4082-9.
82. WOLF, R., BARONI, A., GRECO, R., DONNARUMMA, G. & RUOCCO, E. (2002) Quinine sulfate and bacterial invasion, *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 1, 5.
83. KAMPIK, D., SCHULTE, R. & AUTENRIETH, I. B. (2000) *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections, *Infect Immun*, 68, 2484-92.

84. CHIANG, Y. W., YOUNG, T. F., RAPP-GABRIELSON, V. J. & ROSS, R. F. (1991) Improved protection of swine from pleuropneumonia by vaccination with proteinase K-treated outer membrane of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) pleuropneumoniae, *Vet Microbiol*, 27, 49-62.
85. FENWICK, B. & HENRY, S. (1994) Porcine pleuropneumonia, *J Am Vet Med Assoc*, 204, 1334-40.
86. DEVENISH, J., ROSENDAL, S. & BOSSE, J. T. (1990) Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus* pleuropneumoniae, *Infect Immun*, 58, 3829-32.
87. INZANA, T. J. (1991) Virulence properties of *Actinobacillus* pleuropneumoniae, *Microb Pathog*, 11, 305-16.
88. FULLER, T. E., THACKER, B. J., DURAN, C. O. & MULKS, M. H. (2000) A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus* pleuropneumoniae as a live attenuated vaccine, *Vaccine*, 18, 2867-77.
89. INZANA, T. J., TODD, J. & VEIT, H. P. (1993) Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus* pleuropneumoniae for use in live vaccines, *Infect Immun*, 61, 1682-6.
90. PRIDEAUX, C. T., LENGHAUS, C., KRYWULT, J. & HODGSON, A. L. (1999) Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus* pleuropneumoniae produced by site-specific mutagenesis of the *ApxII* operon, *Infect Immun*, 67, 1962-6.
91. INZANA, T. J., GLINDEMANN, G., FENWICK, B., LONGSTRETH, J. & WARD, D. (2004) Risk assessment of transmission of capsule-deficient, recombinant *Actinobacillus* pleuropneumoniae, *Vet Microbiol*, 104, 63-71.
92. DUBREUIL, J. D., JACQUES, M., MITTAL, K. R. & GOTTSCHALK, M. (2000) *Actinobacillus* pleuropneumoniae surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity, *Anim Health Res Rev*, 1, 73-93.
93. POHLSCHRODER, M., PRINZ, W. A., HARTMANN, E. & BECKWITH, J. (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme, *Cell*, 91, 563-6.

94. GAGNE, A., LACOUTURE, S., BROES, A., D'ALLAIRE, S. & GOTTSCHALK, M. (1998) Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils, *J Clin Microbiol*, 36, 251-4.
95. AMERO, S. A., JAMES, T. C. & ELGIN, S. C. (1994) Production of antibodies using proteins in gel bands, *Methods Mol Biol*, 32, 401-6.